

F 0 1 / E P 0 3 / 0 3 1 0 2

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

16 SEP 2003

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



RECD 26 SEP 2003

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 58 971.2

Anmeldetag: 16. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

Bezeichnung: Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

IPC: A 23 K, C 12 N, A 01 H

Bemerkung: Die nachgereichte vollständige Seite 60 der Beschreibung ist am 10. Januar 2003 eingegangen.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag


Stanschus

Patentansprüche

1. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.
5
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung 10 von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.
15
4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung 20 zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere 25 oral verabreicht werden.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung 30 in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.
- 35 7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatidae.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
- 5 10. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Eidotter.
- 10 11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
12. Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfutterkomponenten.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln ermöglicht.
- 20 14. Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 25 15. Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.
- 30 16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt werden und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht werden.
- 35

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form prozessiert werden, die eine Beimischung zu Tierfutterzubereitungen ermöglicht.
18. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht werden.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form prozessiert werden, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes durch genetische Veränderung in die Lage versetzt wurden, Astaxanthin herzustellen.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Fische, Crustaceae, Galliformes und Anatidae.
22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere ausgewählt sind aus der Gruppe Salmoniden, Shrimps, Krebs, Hühner, Enten, Gänse und Flamingo.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Tierprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Fleisch, Haut, Feder und Ei.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.
25. Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen- oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.
26. Tierfutterzubereitung, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflan-

zentellen der Gattung Tagetes.

27. Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- 5
28. Pigmentiermittel nach Anspruch 27, bestehend aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extraktén von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.
- 10
29. Pigmentiermittel nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen verwendet.

Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als
Futtermittel

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflan-
zenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen
Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren
zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren
10 zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmen-
tierter Tiere und Tierprodukte.

10

Aufgrund seiner farbgebenden Eigenschaften wird Astaxanthin als Pigmentierstoff in der Tierer-
nährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpzucht verwendet.

15

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Synthesever-
fahren. Natürliches Astaxanthin, wird heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen
Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fer-
mentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung
20 gewonnen.

20

Synthetisches oder durch Isolierung gewonnenes natürliches Astaxanthin wird durch spezielle
Formulierungstechniken zur Erhöhung der Lagerfähigkeit chemisch und/oder physikalisch stabi-
lisiert und für den jeweiligen Verwendungszweck entsprechend der gewünschten Applikations-
25 bereiche und Bioverfügbarkeiten aufbereitet.

30

WO 9201754 beschreibt eine astaxanthinhaltige Wildtypflanze der Spezies *Adonis aestivalis*.
Ferner offenbart das Dokument die Verwendung der astaxanthinhaltigen Petalen von *Adonis*
aestivalis sowie deren Extrakte als Fischfutter oder als Zusatz in Fischfutter zur Pigmentierung
von Fischen.

35

Die Verwendung von *Adonis aestivalis* als pflanzliche Quelle für Astaxanthin zur Pigmentierung
von Fischen im Stand der Technik weist jedoch den Nachteil auf, dass der Ertrag an asta-
xanthinhaltiger Biomasse und damit an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial pro Anbaufläche
sehr gering ist, und somit nur doch kostenintensiven Anbau großer Flächen eine befriedigende
Menge an astaxanthinhaltigem Pflanzenmaterial erhalten werden kann. Dies führt zu hohen
Kosten bei der Herstellung entsprechender Pigmentiermittel.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, Pigmentiermittel zur Verfügung zu stellen, die den Nachteil des Standes der Technik nicht mehr aufweisen.

Demgemäß wurde gefunden, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung 5 Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere verwendet werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzen- 10 teile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflan-zen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entspre- chenden Tierprodukte verwendet.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzen der Gattung Tagetes werden bevorzugt Pflanzen der Gat- 20 tigung Tagetes verstanden, die in mindestens einem Teil der Pflanze einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Das Astaxanthin kann in freier Form in Form von Fettsäure-Di- oder Monoester vor- liegen. Bevorzugte Pflanzen der Gattung Tagetes sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies Tagetes erecta, Tagetes patula, die auch als Marigold bezeichnet werden, Tagetes lucida, Ta- getes pringlei, Tagetes palmeri, Tagetes minuta, Tagetes lemmonii, Tagetes tenuifolia, oder Tagetes campanulata, besonders bevorzugt Tagetes erecta oder Tagetes patula.

Unter astaxanthinhaltigen Pflanzenteilen von Pflanzen der Gattung Tagetes werden vorzugswei- 25 se Teile von Pflanzen verstanden, die in mindestens einem Teil des Pflanzenteils einen Gehalt an Astaxanthin aufweisen. Bevorzugte Pflanzenteile sind beispielsweise Blüten, Blütenköpfe oder besonders bevorzugt Blütenblätter, die auch als Petalen bezeichnet werden.

Wildtypfarnzen der Gattung Tagetes weisen kein Astaxanthin jedoch Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin in Blüten auf. Es wurde jedoch erfindungsgemäß gefunden, dass die Pflanzen der Gattung Tagetes beispielsweise durch genetische Veränderung in die Lage versetzt werden können, Astaxanthin herzustellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Pflanzen der Gattung Tagetes beispielsweise 30 dadurch in die Lage versetzt Astaxanthin herzustellen, indem in den genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes im Vergleich zum Wildtyp eine Ketolase-Aktivität verursacht wird.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein

5 Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß die entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangspflanze der Gattung Tagetes verstanden.

10 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) der Gattung Tagetes oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze der Gattung Tagetes oder beides verstanden werden.

15 Vorzugsweise wird unter "Wildtyp" für die Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität, und für die nachstehend beschriebene Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Astaxanthin jeweils eine Referenzpflanze verstanden.

20 Diese Referenzpflanze der Gattung Tagetes ist Tagetes erecta, Tagetes patula, Tagetes lucida, Tagetes pringlei, Tagetes palmeri, Tagetes minuta oder Tagetes campanulata, besonders bevorzugt Tagetes erecta, ganz besonders bevorzugt Tagetes erecta L., Accession number: TAG-72, Sorte Orangenprinz, erhältlich aus der Genbank des IPK, Corrensstr. 3, D-06466 Gatersleben.

25 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30 Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen Extrakten wird mit den Substraten beta-Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid- (Soyalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

35 Die erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanze der Gattung Tagetes weist in dieser, bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität, vorzugsweise in Blütenblättern, auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, trans-

gen eine Ketolase zu exprimieren.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Ketolase-Aktivität in den Pflanzen der Gattung Tagetes durch Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure

5 kodierend eine Ketolase.

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolaser kodieren in die Ausgangspflanze der Gattung Tagetes.

10 Dazu kann prinzipiell jedes Ketolase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Ketolase codiert verwendet werden.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze der Gattung Tagetes nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozes- 20 sierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase und die entsprechenden Ketolasen, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können sind beispielsweise Sequenzen aus

25 Haematoccus pluvialis, insbesondere aus Haematoccus pluvialis Flotow em. Wille (Accession NO: X86782; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 1, Protein SEQ ID NO: 2),

Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Accession NO: D45881; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 3, Protein SEQ ID NO: 4),

30 Agrobacterium aurantiacum (Accession NO: D58420; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein SEQ ID NO: 6),

Alicaligenes spec. (Accession NO: D58422; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein SEQ ID NO: 35 8),

Paracoccus marcusii (Accession NO: Y15112; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 9, Protein SEQ ID NO: 10).

Synechocystis sp. Strain PC6803 (Accession NO: NP442491; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 11, Protein SEQ ID NO: 12).

Bradyrhizobium sp. (Accession NO: AF218415; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 13, Protein SEQ ID NO: 14).

Nostoc sp. Strain PCC7120 (Accession NO: AP003592, BAB74888; Nukleinsäure: SEQ ID NO: 15, Protein SEQ ID NO: 16),

10 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000195, Basenpaar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 81); Protein: Acc.-No. ZP_00111258 (SEQ ID NO: 82) (als putatives Protein annotiert),

15 *Nostoc punctiforme* ATTC 29133, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basenpaar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 83), Protein: (SEQ ID NO: 84) (nicht annotiert),

Synechococcus sp. WH 8102, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABD01000001, Basenpaar 1,354,725-1,355,528 (SEQ ID NO: 85), Protein: Acc.-No. ZP_00115639 (SEQ ID NO: 86) (als putatives Protein annotiert), oder

20 *Brevundimonas aurantiaca* (WO 02079395).

Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, 25 deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den vorstehend beschriebenen Sequenzen und insbesondere mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 leicht auffinden.

30 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder 16 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35 Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenter (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

6

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

5

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50_C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50_C, bevorzugt bei 65_C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

10

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22_C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65_C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42_C ausgeführt.

20 Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65_C, oder

25

(ii) 6X SSC bei 45_C, oder

(iii) 6X SSC bei 68_C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

30 (iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68_C, oder

(v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42_C, oder

35

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42_C, oder

(vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll; 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42_C, oder

5 (viii) 2X oder 4X SSC bei 50_C (moderate Bedingungen), oder

(ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42_C (moderate Bedingungen).

(2) Waschschrifte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

10 (i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50_C, oder

(ii) 0.1X SSC bei 65_C, oder

15 (iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68_C, oder

(iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42_C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42_C, oder

20 (vi) 2X SSC bei 65_C (moderate Bedingungen).

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes bringt man Nukleinsäuren ein, die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

30 Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

35 In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein die ein Protein kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren ab-

geleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 30 %, bevorzugter mindestens 40 %, bevorzugter mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 60 %, bevorzugter mindestens 70 %, bevorzugter mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 16 und die enzymatische Eigenschaft einer Ketolase aufweist.

10 Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die, wie vorstehend beschrieben, durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 16 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

15 Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

20 Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

25 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap penalty 10

35 Gap length penalty 10

Pairwise alignment parameter:

K-tuple 1

Gap penalty 3

Window 5

Diagonals saved

5

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das 5 bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder 16, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptid-10 Sequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der tagetesspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene von Pflanzen der Gattung Tagetes leicht ermitteln.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 in die Pflanze der Gattung ein.

20

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 15 in die Pflanze der Gattung ein.

25

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, 30 Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

35

In einer besonderen bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, daß die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt, funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze der Gat-

tung Tagetes eingebracht.

Besonders bevorzugte Pflanzen der Gattung Tagetes als Ausgangspflanzen oder erfindungsgemäße genetisch veränderte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Spezies Tagetes 5 erecta, Tagetes patula, die auch als Marigold bezeichnet werden, Tagetes lucida, Tagetes pringlei, Tagetes palmeri, Tagetes minuta, Tagetes lemmonii, Tagetes tenuifolia, oder Tagetes campanulata, besonders bevorzugt *Tagetes erecta* oder *Tagetes patula*.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes 10 verwendet, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter Hydroxylase-Aktivität die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Cantaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxyase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Cantaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin oder Cantaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein

5 β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden. .

Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. die gebildete Menge β -Carotin erhöht.

10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.

15 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

20 Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie beta-Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

25 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.); Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

30 Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalyse, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden, (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Pflanzenextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäß genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm.

5 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stomaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedin-

10 gungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält

5 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stomaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

20

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene

25 Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder von Nukleinsäuren kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp.

30

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen 35 mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxylase und/oder β -Cyclase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Pflanzen der Gattung

Tagetes eigenen, endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase verstanden:

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β -Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder β -Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β -Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein in der nicht transformierten Pflanze nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine Hydroxylase und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend eine β -Cyclase in die Pflanze der Gattung Tagetes.

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β -Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β -Cyclase codiert, verwendet werden.

Bei genomischen Hydroxylase- bzw. β -Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das die Wirtspflanze nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw. β -Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 17, Protein: SEQ ID NO: 18).

Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, codierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 19, Protein: SEQ ID NO: 20).

5 In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen und/oder β -Cyclase-Gen vor.

10 In dieser bevorzugten Ausführungsform weist die genetisch veränderte Pflanze beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase auf.

15 20 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO: 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

25 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO: 18 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 18.

35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

15

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 17 in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

15 Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 20 leicht auffinden.

20 Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

25 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 20.

30 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

35 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der pflanzenspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 19 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise,

5 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

10

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Pflanzen der Gattung Tagetes gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität auf.

Unter ϵ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ϵ -Cyclase verstanden.

5

Unter einer ϵ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ϵ -Ionon-Ring zu überführen.

20

Unter einer ϵ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter ϵ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ -Carotin verstanden.

25

Bei einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge δ -Carotin reduziert.

30

Unter einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer ϵ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

35

Die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge, oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge der erfundungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfol-

gen.

Eine Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer ϵ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ϵ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der ϵ -Cyclase). Vorzugsweise wird die ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. die ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder die ϵ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. des ϵ -Cyclase-Proteins oder der ϵ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßigen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

15

Die ϵ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stomaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben werden.

20

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßigen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

25

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stomaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

35 Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nivelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromopast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

- a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, 5 nachstehend auch ϵ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-dsRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein ϵ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist,
- 10 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-antisenseRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ϵ -Cyclase-antisenseRNA gegen ein ϵ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein ϵ -Cyclase-Transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen,
- 15 c) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 20 d) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase sense-Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ϵ -Cyclase-senseRNA genannt, zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 25 e) Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen ein ϵ -Cyclase-Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 f) Einbringen mindestens einer den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 35 g) Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem ϵ -Cyclase-Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Inversion oder Mutation in einem ϵ -Cyclase-Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in besagtes ϵ -Cyclase-Gen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen ϵ -Cyclase-Gensequenzen generiert werden.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Verminderung einer ϵ -Cyclase bzw. seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante einer ϵ -Cyclase oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

5 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer ϵ -Cyclase bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung der ϵ -Cyclase, des Transports der ϵ -Cyclase oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines ϵ -Cyclase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

10

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge durch beispielhafte Ausführungsformen beschrieben:

15

a) Einbringen einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz (ϵ -Cyclase-dsRNA)

20

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

25

30

Unter "Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz" wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

35

Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissozierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

Unter einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch ϵ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur

20

aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

5

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität

10 bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

15

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

Unter dem Begriff " ϵ -Cyclase-Transkript" wird der transkripierte Teil eines ϵ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der ϵ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

Unter einer RNA, die "mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist", ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem 25 Teil des theoretischen Transkriptes der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

Unter "einem Teil" des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren 30 bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorssequenz reichen können. Die optimale Länger der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

21

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-dsRNA Teile des ϵ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Aktivitäten auftreten.

5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die ϵ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ϵ -Cyclase enthält.
10 Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer ϵ -Cyclase bewirken.

Ein doppelsträngige RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

20 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und

25 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

Zur Transformation der Pflanze mit einer ϵ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die ϵ -Cyclase-dsRNA transkriptiert wird.

30 Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkriptierbar in

35 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

5 Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter ε -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder ein Teil derselben verstanden.

10

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der ε -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines ε -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines ε -Cyclase-Gens.

20

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem ε -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der ε -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der ε -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die ε -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von ε -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

25

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines ε -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

30

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die ε -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines ε -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

10 Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines ε -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

15 Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer ε -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 47 oder ein Teil der selben verstanden.

Zur Herstellung der ε -Cyclase-dsRNA-Sequenzen zur Reduzierung der ε -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

20 SEQ ID NO: 40: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der ε -Cyclase

25 SEQ ID NO: 41: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der ε -Cyclase

30 SEQ ID NO: 42: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der ε -Cyclase

35 SEQ ID NO: 43: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der ε -Cyclase

SEQ ID NO: 47: Sense-Fragment des ε -Cyclase-Promotors

SEQ ID NO: 48: Antisense-Fragment des ε -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die

jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten

5 RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen,

10 indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990)

5 Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

20 Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer ϵ -Cyclase gerichtet, so umfasst sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze "Spreading").

25 Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

30 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

35 c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

25

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-
5 Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

10 In einer besonders bevorzugten Aufführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blüten spezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promoters beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

15 Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer ϵ -Cyclase -dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in
20 das Genom vorteilhaft.

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

25 b) Einbringen einer antisense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-antisenseRNA)

Verfahren zur Verminderung eines bestimmten Proteins durch die "antisense"-Technologie sind
30 vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA
35 kodierend für das zu vermindern ϵ -Cyclase. Dadurch wird die Transkription und/oder Trans- lation der ϵ -Cyclase unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bil- dung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genetischer DNA - durch Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genetischen DNA durch spezifische Wechselwirkung
40 in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

Eine ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann unter Verwendung der für diese ϵ -Cyclase kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38 nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann zu der gesamten transkribierten mRNA der ϵ -Cyclase komplementär sein, sich auf die 5 kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid, beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für die ϵ -Cyclase umfasst. Die ϵ -Cyclase-antisenseRNA kann eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 10 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, kann aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. ϵ -Cyclase-antisenseRNAs werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt rekombinant in der Zielzelle exprimiert.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der antisenseRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blüten spezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 28 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

20 Besagte Expressionskassetten können Teil eines Transformationskonstrukt oder Transformationsvektors sein, oder aber auch im Rahmen einer Kotransformation eingeführt werden.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression einer ϵ -Cyclase durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines ϵ -Cyclase-Gens (z.B. einem ϵ -Cyclase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des ϵ -Cyclase-Gens reduziert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807- 815).

30 In einer weiteren Ausführungsform kann die ϵ -Cyclase-antisenseRNA eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen, - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

35 c) Einbringen einer ϵ -Cyclase-antisenseRNA kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA

angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275).

Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von

5 Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beschrieben (u.a. bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591); Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591; Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988)

Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu verminderten ϵ -Cyclases katalytisch zu spalten und so die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die

Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Ver- minderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360

25 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338).

Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes,"

20 Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" be- schrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch de- ren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd

AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Deri- vate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der

25 mRNA des zu supprimierenden ϵ -Cyclases aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus ei- ner Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science

26 261:1411-1418).

30 d) Einbringen einer sense-Ribonukleinsäuresequenz einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase- senseRNA) zur Induktion einer Kosuppression

Die Expression einer ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz (oder eines Teils derselben) in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden ϵ -Cyclase-Gens führen.

35 Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen ϵ -Cyclasegen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze be- schrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das

eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beschrieben (z.B. Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; in US 5,034,323.

5 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 38. Bevorzugt ist die ϵ -Cyclase-senseRNA so gewählt, dass es nicht zu einer Translation der ϵ -Cyclase oder eines Teils desselben kommen kann. Dazu kann beispielsweise der 5'-

10 untranslatierte oder 3'-untranslatierte Bereich gewählt oder aber das ATG-Startkodon deletiert oder mutiert werden.

25 e) Einbringen von DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen ϵ -Cyclase Gene, -RNAs oder Proteine

Eine Verminderung einer ϵ -Cyclase Expression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typ der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Verminderung der Expression. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol

20 Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl

25 Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 - 3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

30 Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines ϵ -Cyclase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen.

35 Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die die ϵ -Cyclase selber inhibieren. Diese proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben (Owen M et al. (1992) Biotech-

nology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

5 f) Einbringen von den ϵ -Cyclase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die ϵ -Cyclase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen ϵ -Cyclase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon; Angell SM et al. (1999) Plant J 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral 10 induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu dem Transkript einer zu verminderten ϵ -Cyclase mittels viralen Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; 15 Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6):937-46).

Bevorzugt wird die VIGS-vermittelte Verminderung unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend 20 für ein ϵ -Cyclase, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1.

25 g) Einbringen von Konstrukten zur Erzeugung eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsminderung an ϵ -Cyclase-Genen

30 Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren bekannt, wie genomische Sequenzen gezielt modifiziert werden können. Dazu zählen insbesondere Verfahren wie die Erzeugung von Knockout-Mutanten mittels gezielter homologer Rekombination z.B. durch Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc. (Hohn B und Puchta H (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323) oder die gezielte Deletion oder Inversion von Sequenzen mittels z.B. sequenzspezifischer Rekombinasen oder Nukleasen (s.u.)

35 Die Verminderung der ϵ -Cyclase-Menge, -Funktion und/oder -Aktivität kann auch durch eine gezielte Insertion von Nukleinsäuresequenzen (z.B. der im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahrens zu insertierenden Nukleinsäuresequenz) in die Sequenz kodierend für eine ϵ -Cyclase (z.B. mittels intermolekularer homologer Rekombination) realisiert werden. Im Rahmen dieser Ausführungsform verwendet man bevorzugt ein DNA-Konstrukt, das zumindest einen Teil der Sequenz eines ϵ -Cyclasegens oder benachbarter Sequenzen umfasst, und so mit diesen in der Zielzelle gezielt rekombinieren kann, so dass durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids das ϵ -Cyclase-Gen so

verändert wird, dass die Funktionalität des ϵ -Cyclase-Gens reduziert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des ϵ -Cyclase-Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und reduziert wird. Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die zu insertierende Sequenz an ihrem 5'- und/oder 3'-Ende

5 von weiteren Nukleinsäuresequenzen (A' bzw. B') flankiert, die eine ausreichende Länge und Homologie zu entsprechenden Sequenzen des ϵ -Cyclase-Gens (A bzw. B) für die Ermöglichung der homologen Rekombination aufweisen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren hundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird die pflanzliche Zelle mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone basierend auf der infolge inaktivierten ϵ -Cyclase selektioniert.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Effizienz der Rekombination gesteigert durch Kombination mit Verfahren, die die homologe Rekombination fördern. Solche Verfahren sind beschrieben und umfassen beispielhaft die Expression von Proteinen wie RecA oder die Behandlung mit PARP-Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, dass die intrachromosomale homologe Rekombination in Tabakpflanzen durch die Verwendung von PARP-Inhibitoren erhöht

20 werden kann (Puchta H et al. (1995) Plant J 7:203-210). Durch den Einsatz dieser Inhibitoren kann die Rate der homologen Rekombination in den Rekombinationskonstrukten nach Induktion des sequenzspezifischen DNA-Doppelstrangbruches und damit die Effizienz der Deletion der Transgensequenzen weiter erhöht werden. Verschiedene PARP Inhibitoren können dabei zum Einsatz kommen. Bevorzugt umfasst sind Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid, 8-Hydroxy-2-

25 methylquinazolin-4-on (NU1025), 1,11b-Dihydro-[2H]benzopyrano-[4,3,2-de]isoquinolin-3-on (GPI 6150), 5-Aminoisoquinolinon, 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinon oder die in WO 00/26192, WO 00/29384, WO 00/32579, WO 00/64878, WO 00/68206, WO 00/67734, WO 01/23386 und WO 01/23390 beschriebenen Substanzen.

30 Weitere geeignete Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene Markerprotein Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992, 20(5):963-976).

35 Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeroplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet. PTGS/TGS-Verfahren sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu verminderten Markerprotein-Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. So kann man unter Verwendung der Markerprotein-Nukleinsäuresequenzen aus einer Art auch die Expression von homologen Markerprotein-Proteinen in anderen Arten effektiv vermindern, ohne, dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden Markerprotein-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch:

15 a) Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen und/oder

20 b) Einbringen mindestens einer ϵ -Cyclase antisense-Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette in Pflanzen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer ϵ -Cyclase aufweisen.

30 Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität blüten spezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blüten spezifischen Promoters oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promoters erfolgt.

Besonders bevorzugt werden die genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes mit folgender Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

5 Genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

10 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen,

genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

5 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen,

20 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen,

25 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen, sowie

30 genetisch veränderte Pflanzen der Gattung Tagetes, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität in Blütenblättern und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität und eine reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

35 Die Herstellung dieser genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei, drei oder vier der beschriebenen Aktivitäten enthalten.

Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität in Blütenblättern beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -

Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Reduzierung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von anti- ϵ -Cyclase-Nukleinsäuresequenzen oder ϵ -Cyclase-Inverted-Repaet-Nukleinsäuresequenz anstelle von Nukleinsäuresequenzen kodierend eine Ketolase erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

Die Herstellung der transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

15 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

20 Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, das jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

35 Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen der Gattung Tagetes und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes, sowie die transgenen Pflanzen der Gattung Tagetes selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der

Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

5

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

10 "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) *Cell* 21:285-294; Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) *Virology* 140:281-288; Gardner et al. (1986) *Plant Mol Biol* 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) *EMBO J* 8:2195-2202).

20 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalin synthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649),
25 den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 30 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

35 Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0

335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanion-induzierbarer Promoter (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) 5 Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

10 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) The Plant Cell

15 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

20 Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

25 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). 30 Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

35 Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus

5 Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

Blüten spezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO

10 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der AP3 Promoter aus Arabidopsis thaliana (siehe Beispiel 1).

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-

Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

15 Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

20 Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der Ketolase in Blütenblättern der erfindungsgemäßen Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, blüten spezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

25 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure kodierend eine Ketolase und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis,

30 E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

35 Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-5 Teil enzymatisch abgespalten werden.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.10

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der Ncol Schnittstelle:

15

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCTTCTCT-
20 CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTACCGGGCGATTGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGGGATCC_BamHI

25

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTG
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCTTCTCT-
CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTACCGGGCGATTGTGCCT-
30 CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGCTGGATCC_BamHI

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTG
35 TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCTTCTCT-
CACTTTTCCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCACCTCCGCCGCCG-
TACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTACCGGGCGATTGTGCCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGGGATCC_BamHI

Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabisopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 16: 11380).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

10

Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen der Gattung Tagetes bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

20

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

25

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

30

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) *Nucl Acids Res.* 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet.* 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the

Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, 5 Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden. 10

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiAch5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente. 15

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

20 Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation 25 durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in 30 Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, 35 Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke

in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in

5 einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN2 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

10 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Ketolase enthalten.

20 Zur Transformation einer Wirtspflanze der Gattung Tagetes mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

25 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

30 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression konstitutiv oder vorzugsweise spezifisch in den Blütenblättern erfolgen.

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen der Gattung Tagetes weisen im Vergleich zum Wildtyp einen Gehalt an Astaxanthin, insbesondere in Petalen auf.

Wie vorstehend erwähnt, betrifft die Erfindung die Verwendung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltiger Extrakte von astaxanthinhaltigen

gen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur Pigmentierung von Tieren und der entsprechenden Tierprodukte verwendet.

10 Unter astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen werden bevorzugt Lösungen, enthaltend Astaxanthin verstanden, die durch Extraktion aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit mindestens einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt wurden. Je nach verwendetem Lösungsmittel und verwendeten weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsverfahren kann das Astaxanthin in beliebigen Reinheitsgraden im Extrakt vorliegen. Es ist vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile vor Extraktion entsprechend aufzubereiten, beispielsweise die Pflanzen oder Pflanzenteile zu trocknen und zu zerkleinern, wobei die Reihenfolge beliebig ist.

15 Astaxanthin kann aus den astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gegebenenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-éther oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch eine solche Extraktion lässt sich Astaxanthin mit hoher Konzentration anreichern.

20 25 Anschließend kann durch Ausschütteln von Astaxanthin und chromatografische Auftrennung des Gemisches die Reinheit von Astaxanthin weiter erhöht werden. Astaxanthin liegt in der Regel als Gemisch aus Mono- und Diestern vor, meist als Ester der Palmitinsäure.

30 Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. Astaxanthinhaltige Pigmentierstoffe pigmentieren und verursachen oder intensivieren in der Regel einen rosa bis rosa-roten Farbton.

35 Bevorzugte Tiere die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können sind Tiere, ausgewählt aus der Gruppe Fische, Crustaceae oder Vögel, insbesondere Galliformes und Anatidae.

Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle.

Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse.

5 Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse.

Bevorzugter Anatridae ist Flamingo.

10 Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten oder Gänse verstanden.

15 Die orale Verabreichung der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere kann direkt erfolgen oder über orale Verabreichung von Tierfutterzubereitungen, denen zuvor die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes beigemischt wurden.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes Tierfutterzubereitungen beigemischt und die Tierfutterzubereitung an Tiere oral verabreicht.

25 Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Beimischung zu Tierfutterzubereitungen in eine Form zu prozessieren, die eine Beimischung zu entsprechenden Tierfutterzubereitung ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich 30 führt.

Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

35 Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.

5 Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung beigemischt werden.

10 Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen eingesetzt werden.

15 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

20 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

25 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise Tierfutterzubereitungen beigemischt werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes.

30 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen durch Zusammenfügen von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes und üblichen Tierfuttermitteln.

35 Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor dem Zusammenfügen mit Tierfuttermitteln in eine Form prozessiert werden, die ein Zusammenfügen

mit Tierfuttermitteln ermöglicht.

5 Beispielsweise für Fische können die Fischfutterzubereitungen weitere übliche Fischfutterkomponenten enthalten, wie beispielsweise Fischmehl und/oder andere Proteine, Öle, wie beispielsweise Fischöl, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.

Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponenten	Gew.-%	Einwaage f. 500 kg	
		kg	
Fischmehl	30,00	150,00	
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00	
Weizenquellstärke	18,00	90,00	
Vitamin-Prämix	0,80	4,00	
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00	
Weizenkleber	20,00	100,00	
Sipernat 50S	3,00	15,00	
Fischöl	8,00	40,00	

10

Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponenten	Gew.-%
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80
Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidantien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

In einer Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in getrockneter und zerkleinerter Pulverform beigemischt.

- 5 Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, können bei Fischfutter beispielsweise in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.
- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Extrakte den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Fischfutterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung, Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfzugaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.
- 15

- 20 Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretenden Astaxanthinverluste zu vermeiden, können flüssige astaxanthinhaltige Extrakte durch die sogenannte PPA-Technik nach dem Extrusions - und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (*post pelleting application*).

- 25 In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform werden die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes direkt an Tiere oral verabreicht.

- 30 Dabei ist es vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes vor der Verabreichung in eine Form zu prozessieren, die eine direkte orale Verabreichung an Tiere ermöglicht und vorzugsweise zu einer hohen Stabilität und Bioverfügbarkeit von Astaxanthin im jeweiligen Anwendungsbereich führt.

- 35 Je nach Tier, an das die orale Verabreichung erfolgen soll und damit je nach Tierfutterzubereitung können dazu verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft sein.

Für astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ist es in dieser Ausführungsform vorteilhaft, die astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile, insbesondere Blütenköpfe und Petalen zu trocknen und/oder zu zerkleinern. Besonders bevorzugt liegen die

astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes in Pulverform vor.

Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter

5 Weise oral an Tiere verabreicht werden.

Für astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, sind in dieser Ausführungsform verschiedene Prozessierungsschritte vorteilhaft.

10 Die astaxanthinhaltigen Extrakte können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt oral an Tiere verabreicht werden.

Die Extrakte können nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von astaxanthinhaltigen Pulver oder Ölen verabreicht werden.

5 Die erhaltenen astaxanthinhaltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl oder geriebene Tagetespetalen, aufgebracht werden, oder in Alginat, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

20 Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte liegen somit bevorzugt in flüssiger oder pulverisierter Form vor.

25 Jede wie auch immer gestaltete Ausführungsform der astaxanthinhaltigen Extrakte astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes, ob prozessiert oder nicht prozessiert, kann in an sich bekannter Weise oral an Tiere verabreicht werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Pigmentiermittel aus astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder aus astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, wobei die astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder die astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes gegebenenfalls wie

vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

Bei besonders bevorzugten Pigmentiermitteln verwendet man als Pflanzenteile Blütenköpfe oder Petalen.

5

Die Erfindung betrifft ferner eine Verfahren zur Pigmentierung von Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

10

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von pigmentierten Tieren oder Tierprodukten durch orale Verabreichung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes an Tiere.

15

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Tierfutter oder Tierfutterzusatz.

20

Die Pigmentiermittel, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakt von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bzw. Tierfuttermittel enthaltend diese Pigmentiermittel weisen weiterhin den Vorteil einer hohen Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit des Pigments Astaxanthin auf.

25

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt.

Beispiel I

Herstellung astaxanthinhaltiger, genetisch veränderter Pflanzen der Gattung Tagetes

30

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

Beispiel I.1:

Amplifikation einer cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille codiert

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* codiert, wurde mittels PCR aus
5 *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität
Göttingen")Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis*
(Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*
10 *Medium* (1.2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0.2 g/l MgCl₂·6H₂O, 0.02 CaCl₂·2H₂O;
pH 6.8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO₄·H₂O) gewachsen war, wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12 000 g wurde der
15 wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst.
20 Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1
25 SEQ ID NO: 29) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure codierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers
30 (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten
35 Primärsequenz codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)

- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

5

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
10	53_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 30 resultierte in einem 1155 Bp-
15 Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert (SEQ ID NO: 22). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz X86782 unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Abbildung 1 und 2, Sequenzvergleiche).

25 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SpHI-Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung in den SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcs Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

30

Beispiel I.2:

Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-terminus codiert

35 Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, wurde mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* Suspensionskultur (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") amplifiziert.

50

Die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 beschrieben.

5

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR3 SEQ ID NO: 31) und eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 29) amplifiziert.

10

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15

- 4 ml einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR1 (SEQ ID NO: 29)
- 0.2 mM PR3 (SEQ ID NO: 31)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ml Aq. Dest.

20

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25 1X 94_C 2 Minuten
35X 94_C 1 Minute
53_C 2 Minuten
72_C 3 Minuten
1X 72_C 10 Minuten

30

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 29 und SEQ ID NO: 31 resultierte in einem 1111 Bp Fragment, das für ein Ketolase Protein codiert, bei dem N-terminalen Aminosäuren (Position 2-16) durch eine einzige Aminosäure (Leucin) ersetzt sind.

35 Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 5'Region (Position 1-53) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 24 durch eine in der Sequenz abweichende Namersequenz ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressions-

vektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 985 Bp SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und
Ligierung mit dem SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus plu-*
5 *vialis* Ketolase mit einem um 14 Aminosäuren verkürztem N-Terminus in der korrekten Orientie-
rung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcs Transitpeptid enthält, heisst pJKETO3.

Beispiel 1.3:

10 Amplifikation einer cDNA, die die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille
(Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") bestehend aus
der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert.

15 Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) bestehend aus der
gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, wurde mittels PCR
unter Verwendung des Plasmids pGKETO2 (in Beispiel 1 beschrieben) und des Primers PR15
(SEQ ID NO: 32) hergestellt. Der Primer PR15 setzt sich zusammen aus einer antisense spezi-
fischen 3'Region (Nucleotide 40 bis 59) und einer myc-Tag codierenden 5'Region (Nucleotide
1 bis 39).

20 Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur
auf 40_C) von pGKETO2 und PR15 erfolgte in einem 11.5 ml Reaktionsansatz, in dem enthal-
ten war:

- 1 mg pGKETO2 PlasmidDNA
- 25 - 0.1 mg PR15 (SEQ ID NO: 32)

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem
enthalten war:

- 30 - 11.5 ml pGKETO2/PR15-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

35 Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80)
bestehend aus der gesamten Primärsequenz und fusioniertem C-terminalem myc-Tag wurde
mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* unter Verwendung eines
sense spezifischen Primers (PR2 SEQ ID NO: 30) und eines antisense spezifischen Primers

(PR15 SEQ ID NO: 32) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein mit fusioniertem C-terminalem myc-Tag codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml einer Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR15 (SEQ ID NO: 32)
- 0.2 mM PR2 (SEQ ID NO: 30)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94_C 2 Minuten
35X 94_C 1 Minute
20 53_C 1 Minute
72_C 1 Minute
1X 72_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO:32 und SEQ ID NO:30 resultierte in einem 1032 Bp-

25 Fragment, das für ein Protein codiert, bestehend aus der gesamten Primärsequenz der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* als zweifache translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptide am N-Terminus und dem myc-Tag am C-Terminus.

Das Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy (Promega) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7- und SP6 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 22 identische Sequenz, wobei die 3'Region (Position 993 bis 1155) der SEQ ID NO: 22 im Amplifikat SEQ ID NO: 26 durch eine in der abweichende Sequenz aus 39 Bp ersetzt wurde. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

35

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1038 Bp EcoRI-SpHI Fragmentes aus pGEM-Teasy und Ligierung mit dem EcoRI-SpHI geschnittenen Vektor pJIT117. Durch die Ligation entsteht eine translationale Fusion zwischen dem C-Terminus der rbcS Transitpeptidsequenz und dem N-Terminus der Ketolase Sequenz. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase mit

fusioniertem C-terminalem myc-Tag in der korrekten Orientierung als translationale N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO4.

Beispiel 1.4:

5 Amplifikation einer DNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolase aus *Nostoc* sp. PCC 7120 codiert

Die DNA, die für die Ketolase aus *Nostoc* PCC 7120 kodiert, wurde mittels PCR aus *Nostoc* PCC 7120 (Stamm der "Pasteur Culture Collection of Cyanobacterium") amplifiziert.

10

Für die Präparation von genetischer DNA aus einer Suspensionskultur von *Nostoc* PCC 7120, die 1 Woche mit Dauerlicht und konstantem Schütteln (150 rpm) at 25°C in BG 11-Medium (1.5 g/l NaNO₃, 0.04 g/l K₂PO₄·3H₂O, 0.075 g/l MgSO₄·H₂O, 0.036 g/l CaCl₂·2H₂O, 0.006 g/l citric acid, 0.006 g/l Ferric ammonium citrate, 0.001 g/l EDTA disodium magnesium, 0.04 g/l Na₂CO₃, 1 ml trace metal mix A5+Co (2.86 g/l H₃BO₃, 1.81 g/l MnCl₂·4H₂O, 0.222 g/l ZnSO₄·7H₂O, 0.39 g/l NaMoO₄·2H₂O, 0.079 g/l CuSO₄·5H₂O, 0.0494 g/l Co(NO₃)₂·6H₂O) gewachsen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert.

20 Protokoll für DNA Isolation aus *Nostoc* PCC7120:

Aus einer 10 ml Flüssigkultur wurden die Bakterienzellen durch 10minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerstoßen und gemahlen. Das Zellmaterial wurde in 1 ml 10mM Tris HCl (pH 7.5) re-suspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (2ml Volumen) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) wurde die Zellsuspension für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 500 µl Phenol extrahiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 13 000 upm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion mit Phenol wurde 3mal wiederholt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 0.6 Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und unter Erhitzung auf 65°C gelöst.

35 Die Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase aus *Nostoc* PCC 7120, wurde mittels "polymerase chain reaction" (PCR) aus *Nostoc* PCC 7120 unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (NOSTF, SEQ ID No. 87) und eines antisense-spezifischen Primers (NOSTG, SEQ ID NO. 88) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5

- 1 ul einer *Nostoc PCC 7120* DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM NOSTF (SEQ ID No. 87)
- 0.2 mM NOSTG (SEQ ID No. 88)

10

- 5 ul 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ul R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25.8 ul Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	55°C	1 Minuten
	72°C	3 Minuten
20	1X	72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 87 und SEQ ID No. 88 resultierte in einem 805 Bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz kodiert (SEQ ID No. 89). Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T (Promega) kloniert und der Klon pNOSTF-G erhalten.

25

Sequenzierung des Klons pNOSTF-G mit dem M13F- und dem M13R-Primer bestätigte eine Sequenz, welche mit der DNA-Sequenz des Datenbankeintrages AP003592 identisch ist. Diese Nukleotidsequenz wurde in einem unabhängigem Amplifikationsexperiment reproduziert und 30 repräsentiert somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Nostoc PCC 7120*.

35

Dieser Klon pNOSTF-G wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet. Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1027 Bp SphI-Fragmentes aus pGEM-T und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die Ketolase von *Nostoc* in der korrekten Orientierung als N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJNOST.

Beispiel I.5:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

5 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters d35S aus CaMV (Franck et al. 1980, Cell 21: 285-294). Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

10 Die Herstellung einer Expressionskassette für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

15 Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5KETO2 wurde das 2.8 Kb SacI-Xhol Fragment aus pJKETO2 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte). In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment d35S den duplizierten 35S Promoter (747 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, Fragment term (761 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

20 Beispiel I.5A:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase in *Tagetes erecta*.

25 Die Expression der Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

30 Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer PR7 (SEQ ID NO: 33) und PR10 (SEQ ID NO: 36) hergestellt.

35 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

56

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 100 ng genomischer DNA aus *A.thaliana*
- 5 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 10 - 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 15 1X 94_C 2 Minuten
- 35X 94_C 1 Minute
- 50_C 1 Minute
- 72_C 1 Minute
- 1X 72_C 10 Minuten

20 Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten.

25 Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

30 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 33) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 35) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 34) und PR10 (SEQ ID NO: 36) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

35 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200-9771 und Region 9526 bis 9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 al Reaktionsan-

sätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 5 - 0.2 mM sense Primer (PR7 SEQ ID NO: 33 bzw. PR8 SEQ ID NO: 34)
- 0.2 mM antisense Primer (PR9 SEQ ID NO: 35 bzw. PR10 SEQ ID NO: 36)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

10

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

15

- 1X 94_C 2 Minuten
- 35X 94_C 1 Minute
- 50_C 1 Minute
- 72_C 1 Minute
- 1X 72_C 10 Minuten

20 Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 0.5 mg A7/9 Amplifikat
- 0.25 mg A8/10 Amplifikat

30 Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 ml gA7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 35 - 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 33) und eines antisense spe-

zifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 36) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

5 Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 10 - 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 33)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 36)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
20	50_C	1 Minute
	72_C	1 Minute
1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 33 und SEQ ID NO: 36 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

35 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJAP3PKETO2 wurde das 1027 Bp SpHI-Fragment KETO2 in den SpHI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO2 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO2.

Zur Herstellung einer Expressionskassetten pJAP3PKETO4 wurde das 1032 Bp SpHI-EcoRI Fragment KETO4 (in Beispiel 3 beschrieben) in den SpHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment KETO4 in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJAP3PKETO4.

5

Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P-kontrollierten Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PKETO2 wurde das 2.8 KB bp SacI-Xhol Fragment aus pJAP3PKETO2 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte). In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment KETO2 (1027 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die *Haematococcus pluvialis* Ketolase, 15 Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV

Beispiel I.5.B:

Herstellung von Expressionsvektoren zur konstitutiven Expression der *Nostoc* sp. PCC 7120 Ketolase in *Tagetes erecta*.

20

Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle des konstitutiven Promoters FNR (Ferredoxin NADPH Oxidoreductase) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression erfolgte mit dem Transitpeptid rbcS aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715).

25

Das DNA Fragment, das die FNR Promotorregion -635 bis -1 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer FNR-1 (SEQ ID No.90) und FNR-2 (SEQ ID No. 91) hergestellt.

30

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das FNR-Promotorfragment FNR1-2 (-635 bis -1) beinhaltet, erfolgte in einem 50 ul Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

35

- 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM FNR-1 (SEQ ID No. 90)
- 0.2 mM FNR-2 (SEQ ID No. 91)

60

- 5 μ l 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 μ l Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 μ l Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
10	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

15 Sequenzierung des Krons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

20 Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJTFNR.

30 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJTFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

35 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-XbaI

Fragment aus pJFNRNOST mit dem SacI-XbaI geschnittenen Vektor

- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

5 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 94°C 2 Minuten
35X 94°C 1 Minute
50°C 1 Minute
10 72°C 1 Minute
1X 72°C 10 Minuten

Das 653 bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pFNR erhalten.

15

Sequenzierung des Klons pFNR bestätigte eine Sequenz, die mit einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 5 von *Arabidopsis thaliana* (Datenbankeintrag AB011474) von Position 70127 bis 69493 übereinstimmt. Das Gen beginnt bei Basenpaar 69492 und ist mit "Ferredoxin-NADP+ Reductase" annotiert.

20

Dieser Klon heisst pFNR und wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

25 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 635 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pFNR und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter FNR anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJITFNR.

30 Zur Herstellung einer Expressionskassette pJFNRNOST wurde das 805 bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1 beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITFNR kloniert. Der Klon, der das Fragment NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heisst pJFNRNOST.

35 Die Herstellung einer Expressionskassette für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Expressionsvektor mit der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des *Tagetes*-Expressionsvektors pS5FNRNOST wurde das 2.4 Kb SacI-Xhol Fragment (partielle SacI Hydrolyse) aus pJFNRNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 5, Konstrukt-karte). In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment FNR Pro-

motor den duplizierten FNR Promotor (655 bp), Fragment *rbcS Transit Peptid* das *rbcS* Transit-peptid aus Erbse (204 bp), Fragment *Nost Ketolase* (799 bp) die gesamte Primärsequenz, kodierend für die *Nostoc* Ketolase, Fragment *35S Terminator* (761 bp) das Polyadenylierungs-signal von CaMV.

5

Beispiel I.5C:

Herstellung von Expressionsvektoren zur blütenspezifischen Expression der *Nostoc sp. PCC 7120* Ketolase in *Tagetes erecta*.

10 Die Expression der Ketolase aus *Nostoc* in *Tagetes erecta* erfolgte mit dem Transitpeptid *rbcS* aus Erbse (Anderson et al. 1986, Biochem J. 240:709-715). Die Expression erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

15

Das DNA Fragment, das die AP3 Promoterregion -902 bis +15 aus *Arabidopsis thaliana* beinhaltet, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethoden aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) sowie der Primer AP3-1 (SEQ ID No.93) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) hergestellt.

20

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) beinhaltet, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25

- 100 ng genomicscher DNA aus *A.thaliana*
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1 (SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)

30

- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute

1X 72°C 10 Minuten

Das 929 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3 erhalten.

5

Sequenzierung des Klons pAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298-10200) unterscheidet. Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die tatsächliche Nukleotidsequenz in den verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen.

10

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pAP3 hergestellt. Die Region 10200 - 9771 wurde mit den Primern AP3-1 (SEQ ID No. 93) und Primern AP3-4 (SEQ ID No. 96) amplifiziert (Amplifikat A1/4), die Region 9526-9285 wurde mit den AP3-3 (SEQ ID No. 95) und AP3-2 (SEQ ID No. 94) amplifiziert (Amplifikat A2/3).

15

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die die Regionen Region 10200 - 9771 und Region 9526-9285 des AP3 Promoters beinhalten, erfolgte in 50 ul Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

25

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM sense Primer (AP3-1 SEQ ID No. 93 bzw. AP3-3 SEQ ID No. 95)
- 0.2 mM antisense Primer (AP3-4 SEQ ID No. 96 bzw. AP3-2 SEQ ID No. 94)
- 5 ul 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ul Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ul Aq. Dest.

30

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35

- 1X 94°C 2 Minuten
- 35X 94°C 1 Minute
- 50°C 1 Minute
- 72°C 1 Minute
- 1X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A1/4 und A2/3, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670 - 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A1/4 und A2/3 erfolgte in einem 17.6 μ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0.5 μ g A1/4 Amplifikat
- 0.25 μ g A2/3 Amplifikat

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 μ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17.6 μ l A1/4 und A2/3-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 μ M dNTPs
- 2 μ l 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AP3-1 SEQ ID No. 93) und eines antisense spezifischen Primers (AP3-2 SEQ ID No. 94) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 μ l Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM AP3-1(SEQ ID No. 93)
- 0.2 mM AP3-2 (SEQ ID No. 94)
- 5 μ l 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 μ l Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 μ l Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt

1X 94°C 2 Minuten

35X 94°C 1 Minute

50°C 1 Minute
72°C 1 Minute
1X 72°C 10 Minuten

5 Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 93 (AP3-1) und SEQ ID No. 94 (AP3-2) resultierte in
einem 783 Bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat
wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pAP3P erhalten.
Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region
10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 - 9526 deletiert wurde. Diese
10 Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988,
Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

15 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 783 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pAP3P und
Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P
anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJITAP3P. Zur Herstellung einer
Expressionskassette pJAP3NOST wurde das 805 Bp SpHI-Fragment NOSTF-G (in Beispiel 1
beschrieben) in den SpHI geschnittenen Vektor pJITAP3P kloniert. Der Klon, der das Fragment
NOSTF-G in der korrekten Orientierung als N-terminale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid ent-
hält, heißt pJAP3PNOST.

20 20 Die Herstellung einer Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der
AP3P-kontrollierten Ketolase aus Nostoc in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des
binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

25 25 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AP3PNOST wurde das 2.6 KB bp SacI-Xhol (par-
tielle SacI Hydrolyse) Fragment aus pS5AP3PNOST mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor
pSUN5 ligiert (Abbildung 6, Konstrukt-karte). In der Abbildung 6 beinhaltet Fragment AP3P den
modifizierten AP3P Promoter (783 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (207
bp), Fragment NOSTF-G (792 bp) die gesamte Primärsequenz codierend für die Nostoc Ketola-
se, Fragment term (795 bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

30 Beispiel I.6:
Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

35 35 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and
Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung
erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20-200 mE/3 bis 16 Wochen,
bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

5

Ein beliebiger *Agrobakterium tumefaciens* Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *paf*) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird (beispielsweise pS5KETO2 und pS5AP3PKETO2), über Nacht angezogen und für die Co-

10 Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wird für die C-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

15 Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der *Agrobakterien*-suspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 mMol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 300 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

35 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurzelung

lung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

5 • Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

10 • Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

15 • Die Zugabe von AgNO_3 (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

20 • Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

• Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

25 Mit pS5KETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs18-1 und cs18-2, mit pS5AP3PKETO2 wurde beispielsweise erhalten: cs19-1, cs19-2 und cs19-3.
Mit pS5FNRNOST wurde beispielsweise erhalten: ms 103-1, ms103-2, ms103-3, mit pS5AP3NOST wurde beispielsweise erhalten: ms 104-1, ms104-2, ms104-3.

30 Beispiel I.8
Charakterisierung der transgenen Pflanzenblüten

Beispiel I.8.1

Trennung von Carotinoidestern in Blütenblättern transgener Pflanzen

35 Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Die Blütenblätter der transgenen Pflanzen werden in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Petalenpulver (etwa 40 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel

wird evaporiert und die Carotinoide in 100 bis 200 ml Petrolether/Aceton (5:1, v/v) resuspendiert.

Die Carotinoide werden in konzentrierter Form mittels Dünnschicht-Chromatographie (TLC) auf Silica60 F254- Platten (Merck) in einem organischen Laufmittel (Petrolether/Aceton; 5:1) ent-

5 sprechend ihrer Phobizität aufgetrennt. Gelbe (Xanthophyllester), rote (Ketocarotinoidester) und orange Banden (Mischung aus Xanthophyll- und Ketocarotinoidestern) auf der TLC werden aus-gekratzt.

Die an Silica gebundenen Carotinoide werden dreimal mit 500 ml Aceton eluiert, das Lösungs-

10 mittel evaporiert und die Carotinoide mittels HPLC aufgetrennt und identifiziert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule kann zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide un-terschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Me-

thode (Frazer et al.(2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide ist

15 aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

Beispiel I.9

Enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern und Identifizierung der Carotinoide

20

Allgemeine Arbeitsvorschrift

Gemörsertes Petalenmaterial (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 ml; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Caroti-

25 noide werden anschließend in 400 ml Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0.75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 ml

50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 ml Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 units/ml einer Cho-
lesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200

30 ml Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37C. Nach Zugabe 0.35 g Na₂SO₄·10H₂O und 500 ml Petrolether wird gut gemischt und zentri-
fugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g

Na₂SO₄·10H₂O (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC

35 und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-
VIS-Spektren identifiziert werden.

Beispiel I.10:

Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

5 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blüten-spezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711 bis 1721).

10 Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

15 Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 49) und PR10 (SEQ ID NO: 52) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

20 Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) codiert, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml genomicscher DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 ml Pfu Polymerase (Stratagene)
- 30 - 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 94_C 2 Minuten
- 35 35X 94_C 1 Minute
- 50_C 1 Minute
- 72_C 1 Minute
- 1X 72_C 10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

10 Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 49) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 51) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 50) und PR10 (SEQ ID NO: 52) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

15 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters codieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

20

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49) bzw. PR8 (SEQ ID NO: 50)
- 0.2 mM PR9 (SEQ ID NO: 51) bzw. PR10 (SEQ ID NO: 52)

25

- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0.25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

30

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	50_C	2 Minuten
	72_C	3 Minuten
35	1X	72_C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters,

70

AP3P, in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95_C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40_C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17.6 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5 - 0.5 mg A7/9
- 0.25 mg A8/10

Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30_C) erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10 - 17.6 ml A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 mM dNTPs
- 2 ml 1X Klenow Puffer
- 2U Klenow Enzym

15

Die Nukleinsäure codierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID NO: 49) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID NO: 52) amplifiziert.

20 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

25 - 1 ml Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR7 (SEQ ID NO: 49)
- 0.2 mM PR10 (SEQ ID NO: 52)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (Stratagene)
30 - 0.25 ml Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

35 1X 94_C 2 Minuten
35X 94_C 1 Minute
50_C 1 Minuten
72_C 1 Minuten
1X 72_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID NO: 49 und PR10 SEQ ID NO: 52 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P codiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wo 5 bei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und 10 Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heisst pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter 15 Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID NO: 54) und Primer PR41 (Seq ID NO: 55) hergestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml p35SGUS INT
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR40 (SEQ ID NO: 54)
- 25 - 0.2 mM PR41 (SEQ ID NO: 55)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

30 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94_C	2 Minuten
35X	94_C	1 Minute
	53_C	1 Minuten
35	72_C	1 Minuten
1X	72_C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII

(Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

5 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3' Ende des rbcS Transit-
10 peptides enthält, heißt pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blüten spezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

15 In der Abbildung 7 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment *intron* das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.11

Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blüten spezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5' Region der Epsilon-Cyclase 20 cDNA)

Die Nukleinsäure, die die 5' terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID NO: 56) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID NO: 57) amplifiziert. Die 5' terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5' Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

30 Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulv-
erisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0.8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0.2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2.5 ug Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech)

nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID NO: 53) in cDNA umgeschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

5

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 10 - 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR42 (SEQ ID NO: 56)
- 0.2 mM PR43 (SEQ ID NO: 57)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 15 - 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 20 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR44 (SEQ ID NO: 58)
- 0.2 mM PR45 (SEQ ID NO: 59)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 25 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 30 1X 94_C 2 Minuten
- 35X 94_C 1 Minute
- 58_C 1 Minuten
- 72_C 1 Minuten
- 1X 72_C 10 Minuten

35

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Se-

5 quenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI-
10 Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-
EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der
antisense Orientierung enthält, heisst pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle
Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase und
dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

15 Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall
Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-
Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase
cDNA in der sense Orientierung enthält, heisst pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkri-
20 pptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminalen Region der
Epsilon-Cyclase.

25 Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-
Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petu-
nie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID NO: 76) und
PRCHRC3 (SEQ ID NO: 77) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1
(Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern
M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde
daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC
und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter
CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst pJCI3.

35 Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der
AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter
der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-Xhol Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstrukt-karte).

In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon- cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

10 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-Xhol Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstrukt-karte).

In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel I.12

20 Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

25 Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession NO: AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID NO: 60) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

30 Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel I.11 beschrieben.

35 Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel I.11 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID NO: 53) beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

76

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR46 (SEQ ID NO: 60)
- 0.2 mM PR47 (SEQ ID NO: 61)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
10 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war.

15 - 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR48 (SEQ ID NO: 62)
- 0.2 mM PR49 (SEQ ID NO: 63)
20 - 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25
1X 94_C 2 Minuten
35X 94_C 1 Minute
58_C 1 Minuten
72_C 1 Minuten
30 1X 72_C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 60 und SEQ ID NO: 61 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID NO: 62 und SEQ ID NO: 63 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

35
Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID NO: 38) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktions-

stellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat-Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI

5 Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

10

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragment 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

15 Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-Xhol Fragment aus pJAI5 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstrukt-karte).

20 In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 3sense die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 3anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment *term* (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

25 30 Beispiel I.13

Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomicscher DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 ug genomische DNA in einem 25 ul Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 ml verdünnt und über Nacht bei 16_C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 64) und PR51 (SEQ ID NO: 65) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung,

5 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 11).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

10 Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

15 - 1 ml Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR50 (SEQ ID NO: 64)
- 0.2 mM PR51 (SEQ ID NO: 65)
- 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
20 - 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

25 1X 94_C 2 Minuten
35X 94_C 1 Minute
53_C 1 Minute
72_C 1 Minute
1X 72_C 10 Minuten

30 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 11).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor 35 pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 45. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.2 mM jedes dNTPs
- 0.2 mM PR60 (SEQ ID NO: 66)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)

10

- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 ml aufgefüllt

15

- AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20

- 1X 93_C: 1 Minute, 95_C: 1 Minute
- 5X 94_C: 30 Sekunden, 62_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten
- 1X 94_C: 30 Sekunden, 25_C: 3 Minuten, ramp to 72_C in 3 Minuten, 72_C: 2.5 Minuten
- 15X 94_C: 10 Sekunden, 68_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;
- 94_C: 10 Sekunden, 68_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;
- 94_C: 10 Sekunden, 29_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten
- 1X 72_C: 5 Minuten

25

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

30

- 1 ml einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR61 (SEQ ID NO: 67)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)

35

- 2 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ml aufgefüllt

Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

12X 94_C: 10 Sekunden, 64_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;
94_C: 10 Sekunden, 64_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten;
5 94_C: 10 Sekunden, 29_C: 1 Minute, 72_C: 2.5 Minuten
1X 72_C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

10 - 1 ml einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)

15 - 0.8 mM dNTP
- 0.2 mM PR63 (SEQ ID NO: 68)
- 0.2 mM AD1 (SEQ ID NO: 69)
- 10 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 100 ml aufgefüllt

20 Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt

20X 94_C: 15 Sekunden, 29_C: 30 Sekunden, 72_C: 2 Minuten
1X 72_C: 5 Minuten

25 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 12).

30 Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID NO: 46. Diese Sequenz ist identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 45, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

35 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID NO: 45) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heisst pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

Beispiel I.14

Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von

Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die Promoterrégiion der Epsilon-Cyclase cDNA).

Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blüten- 5 spezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel I.10) oder des blüten- spezifischen Promoters CHRC (Genbank accession NO: AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense- 10 Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel I.10) mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel I.13) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 70) und PR126 (SEQ ID NO: 72) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 71) und PR127 (SEQ ID NO: 73) hergestellt. 15

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war: 20

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR124 (SEQ ID NO: 70)
- 0.2 mM PR126 (SEQ ID NO: 72)
- 25 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28.8 uml Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 ml Reaktionsansatz, in dem enthalten war: 30

- 1 ml cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0.25 mM dNTPs
- 0.2 mM PR125 (SEQ ID NO: 71)
- 0.2 mM PR127 (SEQ ID NO: 73)
- 35 5 ml 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0.25 ml R Taq Polymerase (TAKARA)

- 28.8 ml Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

5 1X 94_C 2 Minuten
35X 94_C 1 Minute
 53_C 1 Minuten
 72_C 1 Minuten
1X 72_C 10 Minuten

10

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

15

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 45. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel I.10) verwendet.

20

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heisst cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

30

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heisst cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

35

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomicscher DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO: 77) und PRCHRC5' (SEQ ID NO: 76) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon

wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC 5 anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heisst cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert.

10 Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID NO: 28 (AL132971) identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

15

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp Sall-Xhol Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den Xhol geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält heisst cs46.

20 Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

25 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-Xhol Fragment aus cs44 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 13, Konstruktkafe). In der Abbildung 13 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

30

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-Xhol Fragment aus cs45 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 14, Konstruktkafe).

35 In der Abbildung 14 beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CAI7 wurde das 3219bp SacI-Xhol Fragment aus cs46 mit dem SacI-Xhol geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 15, Konstrukt-karte)

In der Abbildung 15 beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment *P-sense* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment *intron* das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment *P-anti* das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment AP3P das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

10 Beispiel I.15

Herstellung transgener Tagetes Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

15 Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497), pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C / 20 bis 200 mE / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 mE, für 4 bis 8 Wochen.

20 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

25 Der Agrobakterium tumefaciens Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid pS5AI3 transformiert. Die Anzucht des transformierten A. tumefaciens Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, das eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für 30 die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

30 Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80

mMol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 5 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

10 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

15 20 Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden.

25 30 35

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von AgNO₃ (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit dem Expressionskonstrukt pS5AI3 folgende Linien erhalten:

CS30-1, CS30-3 und CS30-4

Beispiel I.16:

Charakterisierung der transgenen Tagetes Pflanzen mit reduzierter ϵ -Cyclase-Aktivität

Das Blütenmaterial der transgenen Tagetes erecta Pflanzen aus Beispiel I.15 wurde in flüssigem Stickstoff gemörser und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert

5 (dreimal je 500 ml). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 ml Aceton resuspendiert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnten die individuellen Carotinoide quantifiziert wer-

10 den. Die HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

15 Tabelle 2 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen Tagetes- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmen- gen sind in [ug/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kon- trollpflanze sind in Klammern angegeben.

Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten

20 Pflanzen mit reduzierter epsilon-Cyclase-Aktivität einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoi- den des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 2

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt- Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)

Beispiel II

Herstellung astaxanthinhaltiger Pflanzenteile der Gattung Tagetes

30

Die Blütenkopfe oder die Petalen der gemäß Beispiel I.6 hergestellten astaxanthinhaltigen Pflan- zen der Gattung Tagetes werden abgetrennt und getrocknet. Anschließend werden die getrock-

getrockneten Blütenköpfe oder Petalen durch Zerkleinerung in Pulverform überführt.

Beispiel III

Herstellung von astaxanthinhaltigen Extrakten und weitere Aufreinigung

5

Getrocknete Blütenblätter oder getrocknete Blütenköpfe von *Tagetes erecta*, hergestellt nach Beispiel I.6 werden in einem Homogenisator mit einem Überschuß (etwa 10 Teile Lösungsmittel mit einem Teil Pflanzenmaterial) an Lösungsmittel (wie z.B. Aceton, Hexan, Methylenchlorid, Methyl-tertiär-Butyl-Ether, Tetrahydrofuran, Ethanol, Heptan, Cycloheptan oder Petrolether, aber nicht ausschließlich beschränkt auf diese) oder mit einem Lösungsmittelgesmisch (wie z.B. Aceton/Hexan, Ethanol/Hexan (50:50, v/v) oder Aceton/Methanol (7:3, v/v) homogenisiert und im Dunkeln und in der Kühle unter Schütteln extrahiert. Der Rückstand kann bis zu dreimal mit dem verwendeten Lösungsmittel/ Lösungsmittelgemisch re-extrahiert werden. Das gesammelte organische Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch wird mittels Evaporator evaporiert, bis ein eingeengtes Konzentrat erhalten wird. Zusätzlich kann nochmals mit Hexan extrahiert werden. Das verwendete Hexan wird (wiederum im Dunklen und in der Kühle) evaporiert.

10

15

Das solchermaßen hergestellte Konzentrat wird in Hexan gelöst und mittels Säulenchromatographie mit Silica-Material chromatografiert. Ein Teil Silicamaterial wird dazu mit 1-2 Teilen Carotinoidlösung vermischt und in eine Säule gepackt. Die Säule wird ausgiebig mit Hexan im Dunklen und in der Kühle gewaschen. Das Eluat wird verworfen. Ketocarotinoide, besonders Astaxanthin, wird durch eine Mischung von Hexan und Ethanol (2-5% Ethanol in Hexan) eluiert, bis eine orange-rötliche Fraktion eluiert. Dieses orange-rötliche Eluat wird gesammelt, bis die Farbe sich ändert. Das orange-rötlich gefärbte Eluat enthält Astaxanthin als Gemisch aus Mono- und Diestern.

20

25

Beispiel IV

Herstellung von extrudiertem Forellenvfutter, enthaltend astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes* oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung *Tagetes*

Die folgenden Komponenten werden in einem Doppelschneckenextruder extrudiert.

Komponenten	(%)	Einwaage f. 500 kg	
			Kg
Fischmehl	30,00		150,00
Sojavollfettbohnen	20,00		100,00

	88	
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

Die pulverförmigen, prozessierten astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes, beispielsweise hergestellt nach Beispiel II, werden vor der Extrusion als

5 Komponente zugegeben.

Die astaxanthinhaltigen Extrakte oder prozessierten Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes in flüssiger Form, beispielsweise hergestellt nach Beispiel III, werden nach der Extrusion auf das Extrudat aufgesprührt (Applikation durch PPA-

10 Methode).

Die Astaxanthin-Wirkstoff-Dosierung liegt bei 10, 20 und 40 mg Astaxanthin pro kg Diät.

Nach Beendigung des Extrusionsprozesses wird das Extrudat getrocknet und gekühlt.

15

Beispiel V

Orale Verabreichung astaxanthinhaltiger Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung

20 Tagetes an Forellen in einem Forellenstandardfutter – Prüfung der Bioverfügbarkeit.

Das Forellenfutter, enthaltend die erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierstoffe, wird gemäß Beispiel IV hergestellt und an Forellen (durchschnittliche Lebendmasse von 180 g) oral verabreicht. Es werden 3 Konzentrationen getestet: 10, 20 und 40 mg Astaxanthin aus der erfin-

25 dungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung pro kg Diät.

Die Haltung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Die Forellen erhalten standardmäßig eine Adaptationsphase von 14 Tagen.

30 • Während des Fütterungsversuches werden 10 Forellen pro Becken in 80 l Wasser fassenden Durchfluß-Kunststofftanks gehalten. Die Wassertemperatur liegt bei 15°C. Das

Wasser wird biologisch gereinigt und es werden täglich mindestens 10% der Gesamt-wassermenge durch Frischwasser ersetzt.

- Die Beleuchtungsdauer liegt bei 12 Stunden pro Tag, um eine vorzeitige Geschlechtsrei-
5 fe der Tier zu vermeiden.

- Die Anzahl Becken pro Behandlung liegt bei 3. Dies ist äquivalent zu 30 Forellen pro
Dosisstufe.

- Aufbewahrung der Diäten erfolgt bei -20°C, um Astaxanthinverluste zu vermeiden. Das
10 Futter wird portionsweise (wochenweise) aufgetaut und verabreicht.

- Die Versuchsdauer beträgt 8 Wochen.

15 Die Fütterung der Forellen erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- Bei den verabreichten Versuchsdiäten handelt es sich um das gemäß Beispiel IV her-
gestellte extrudierte Forellenfutter, das zusätzlich noch öl-gecoated wird.

- Während der Adaptationsphase wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies
20 Forellenstandardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin verabreicht.

- Als Negativkontrolle wird extrudiertes mit Öl gecoatetes astaxanthin-freies Forellenstan-
dardfutter gemäß Beispiel IV ohne Astaxanthin während des gesamten Versuchszeit-
raumes verabreicht.

25

- Die Fütterung erfolgt 2x täglich von Hand bis zur Sättigung der Tiere.

Untersucht wird der Einfluß der erfindungsgemäßen Astaxanthinpigmentierung sowohl auf Leis-
tungsparameter der Fische, wie Futteraufnahme, Futterverwertung und Lebendmaszezuwachs
30 als auch auf die Bioeffizienz der Pigmentierung.

Statistisch ausgewertet werden durchschnittlicher Futterverbrauch pro Fisch, Futteraufwand und
Lebendmaszezuwachs.

35

Die Pigmentierung der Fische wird durch remissionspektrophotometrische Messungen (Minolta-
a-Wert = Rotwert am Filetanschnitt) und durch Bestimmung des Astaxanthingehalts (mg/kg) im
Filet jeweils im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen.

90

Die Minoltawerte a-Werte, welche den Rotanteil des Farbtons repräsentieren, nehmen mit kleiner werdender Steigung der Funktion dosisabhängig zu. Die Minolta b- Werte, die den Gelbanteil widerspiegeln liegen im negativen Bereich oder bewegen sich um Null. Dies bedeutet der Rotton der Forellenfilets weist eine Abhängigkeit zu der aufgenommenen Astaxanthinmenge

5 auf.

Während des Versuches werden für die beobachteten Leistungsparameter sowohl zwischen als auch innerhalb der Behandlungen (Astaxanthinhaltiges Pulver, astaxanthinhaltiger Extrakt in flüssiger Form, synthetisches Astaxanthin, Negativkontrolle) keine statistisch gerichteten Unterschiede beobachtet.

10 Es zeigt sich, dass astaxanthinhaltige Pflanzen oder Pflanzenteile der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltige Extrakte von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes bei der Pigmentierung von Forellen als Vertreter der Salmoniden bioverfügbar sind und zudem zu keinen adversen Effekten auf die biologische Leistung der Forelle führen.

15

Abbildung 1: Nukleotidsequenzvergleich

Abbildung 2: Proteinsequenzvergleich

KETO2.pro	M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A I K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A	50
X86782.pro	M Q L A A T V M L E Q L T G S A E A L K E K E K E V A G S S D V L R T W A T Q Y S L P S E E S D A A	50
KETO2.pro	R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L A V I G S W A A V F L K A I F Q I K I P T S L D Q L H W	100
X86782.pro	R P G L K N A Y K P P P S D T K G I T M A L R V I G S W A A V F L K A I F Q I K I P T S L D Q L H W	100
KETO2.pro	L P V S S A T A Q L V S G S S S L L H I V V V F F V L E F I Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N	150
X86782.pro	L P V S S A T A Q L V S G T S S S L L D I V V V F F V L E F I Y T G L F I T T H D A M H G T I A M R N	150
KETO2.pro	R Q L N D F I G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I	200
X86782.pro	R Q L N D F I G R V C I S L Y A W F D Y N M L H R K H W E H H N H T G E V G K D P D F H R G N P G I	200
KETO2.pro	V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q E I L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F	250
X86782.pro	V P W F A S F M S S Y M S M W Q F A R L A W W T V V M Q E I L G A P M A N L L V F M A A A P I L S A F	250
KETO2.pro	R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L	300
X86782.pro	R L F Y F G T Y M P H K P E P G A A S G S S P A V M N W W K S R T S Q A S D L V S F L T C Y H F D L	300
KETO2.pro	H W E H H R W P F A P W W E L P N C R R I L S G R G I V P A	329
X86782.pro	H W E H H R W P F A P K W W E L P N C R R I L S G R G I V P A	329

Abbildung 3: Konstrukt zur Überexpression des Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus *H. pluvialis* mit rbcS Transitpeptid aus Erbse unter Kontrolle des d35S-Promoters (Tagetestransformationskonstrukt)

5

10

15

20

25

30

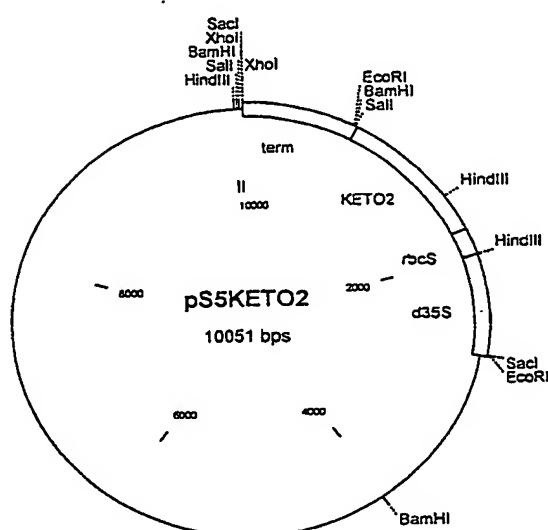


Abbildung 4:

Konstrukt pS5AP3PKETO2 zur Überexpression
der Ketolase (b-C-4-Oxygenase) Proteins aus
H. pluvialis mit rbcS Transitpeptide aus Erbse
unter Kontrolle des AP3P-Promoters (Tagetestrans-
formationskonstrukt).

5

10

15

20

25

30

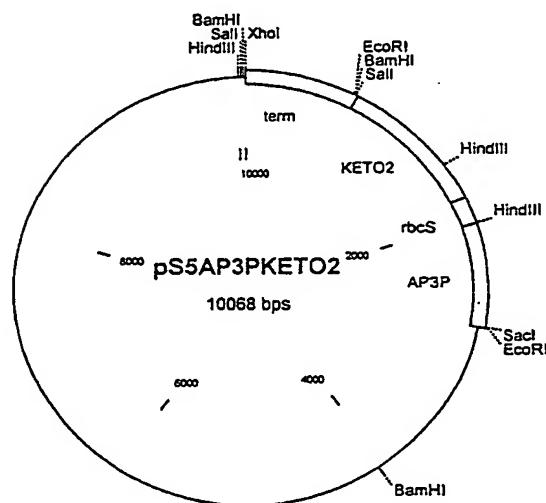


Abbildung 5

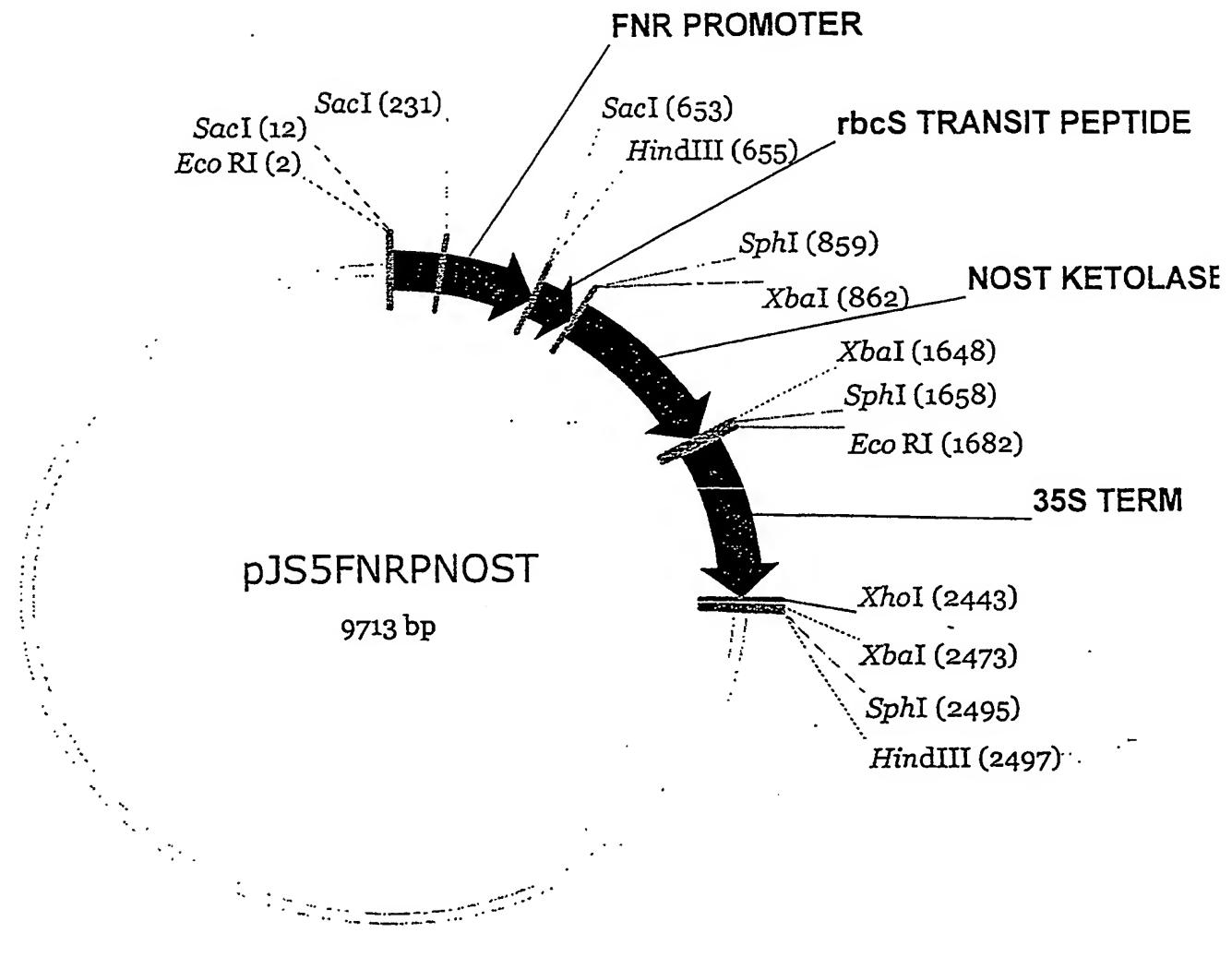


Abbildung 6

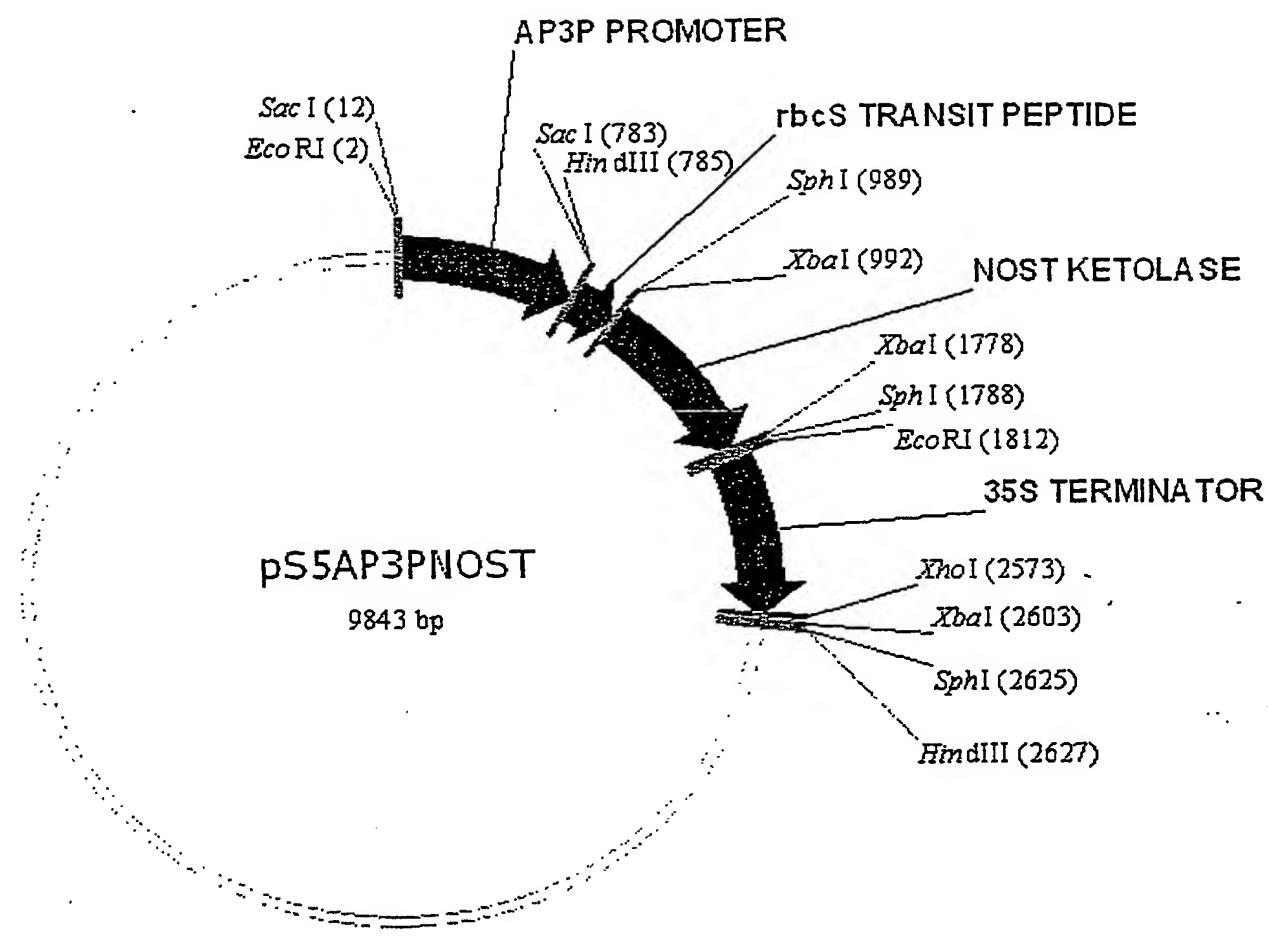
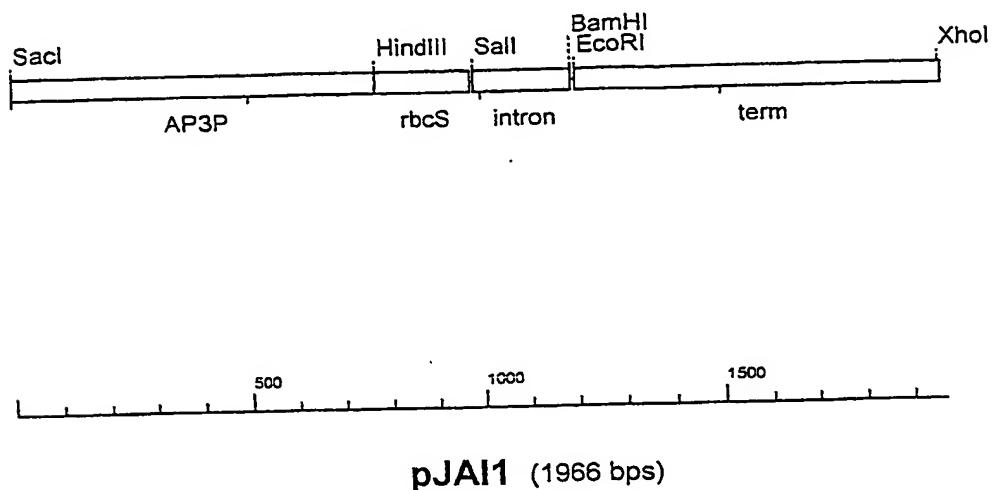


Abbildung 7: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-
Repeat-Expressionskassetten für die blüten-
spezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs
in *Tagetes erecta*

5



10

15

20

25

Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen
Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend
5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA
(AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

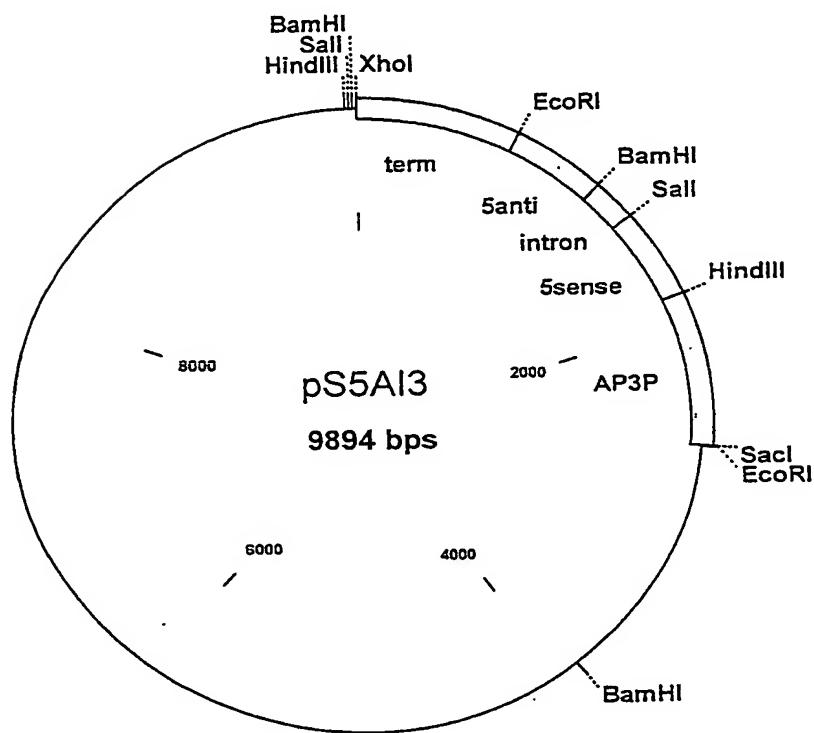


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen
Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend
5'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA
(AF251016) unter Kontrolle des CHRC-PRomoters

5

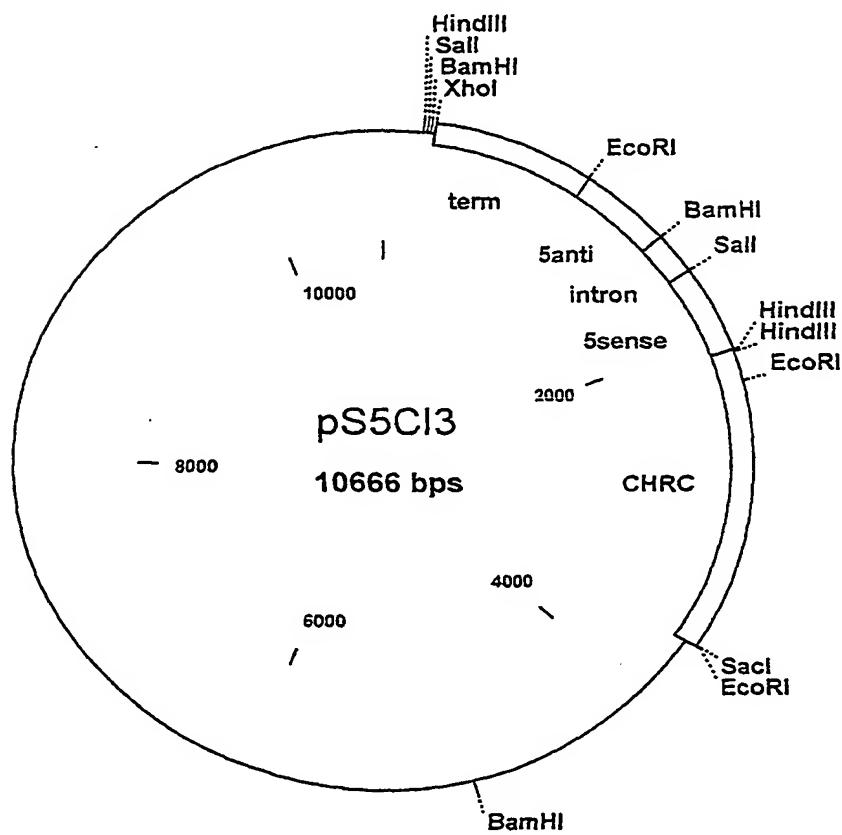


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

5

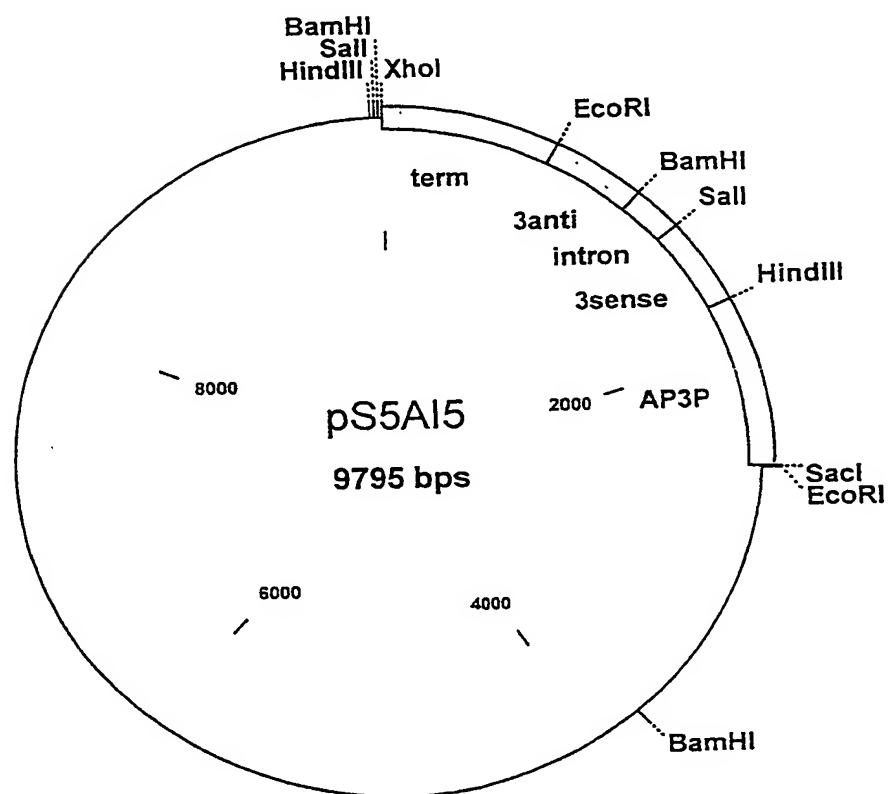


Abbildung 11: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des
Epsilon-Cyclase Promoters enthält

5



10

PR51

PR50

15

ecycP-IPCR (734 bps)

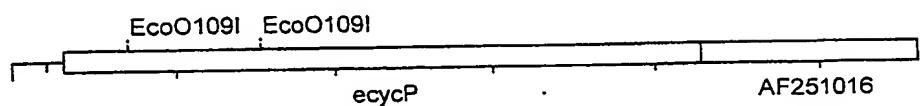
A gel electrophoresis image showing a single, sharp band at the 734 bp position. The gel has markers at 200, 400, and 600 bp. The band is located slightly above the 700 bp mark.

20

25

Abbildung 12: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment
des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

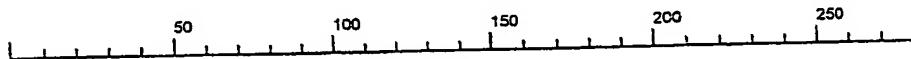
5



10



15



20

25

Abbildung 13: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion
von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5
Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter
Kontrolle des AP3P-Promoters

5

10

15

20

25

30

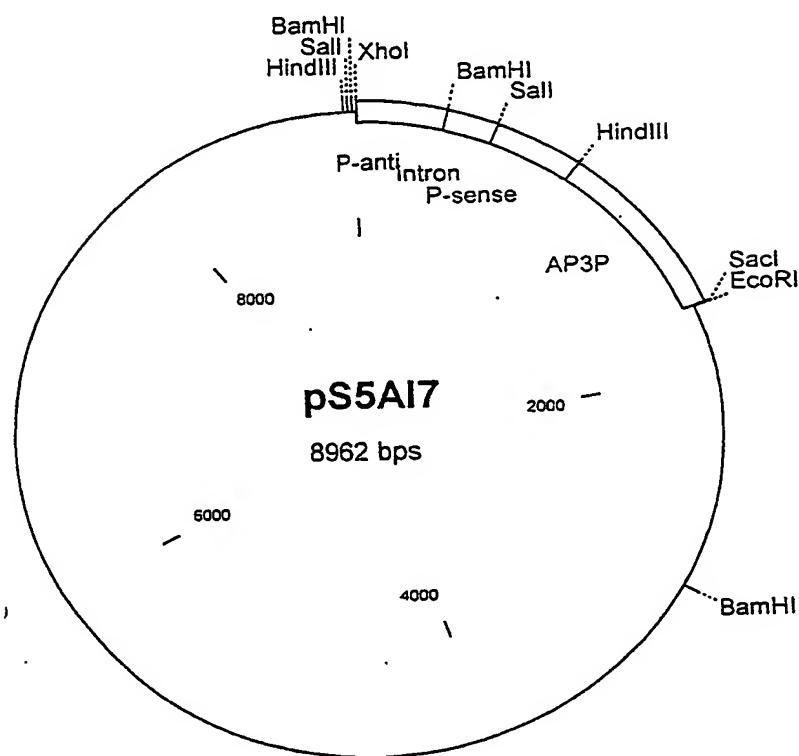


Abbildung 14: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

5

10

20

25

30

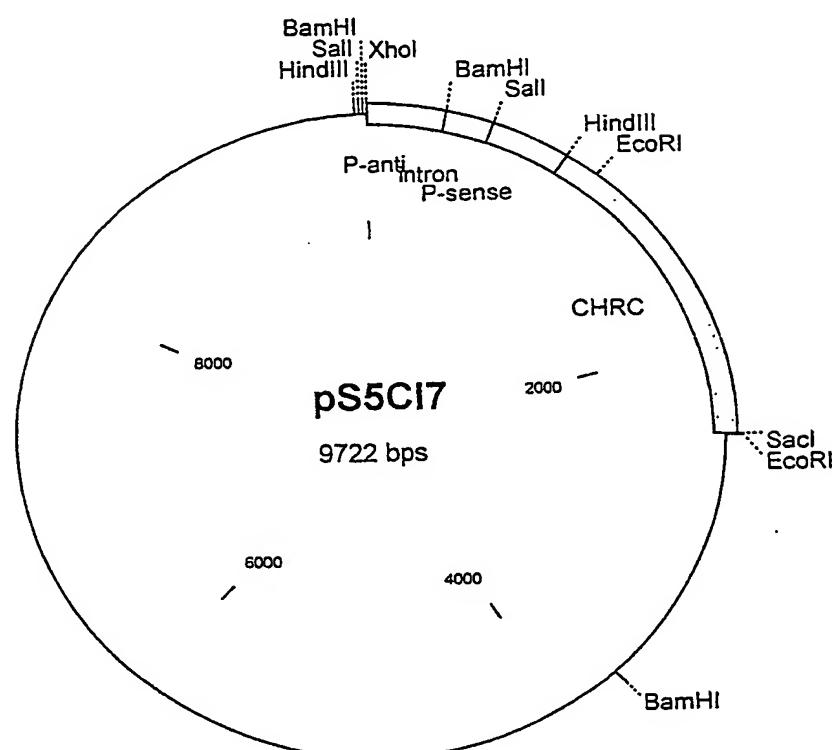


Abbildung 15: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion
von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5
Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter
Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch
des CHRC-Promoters

5

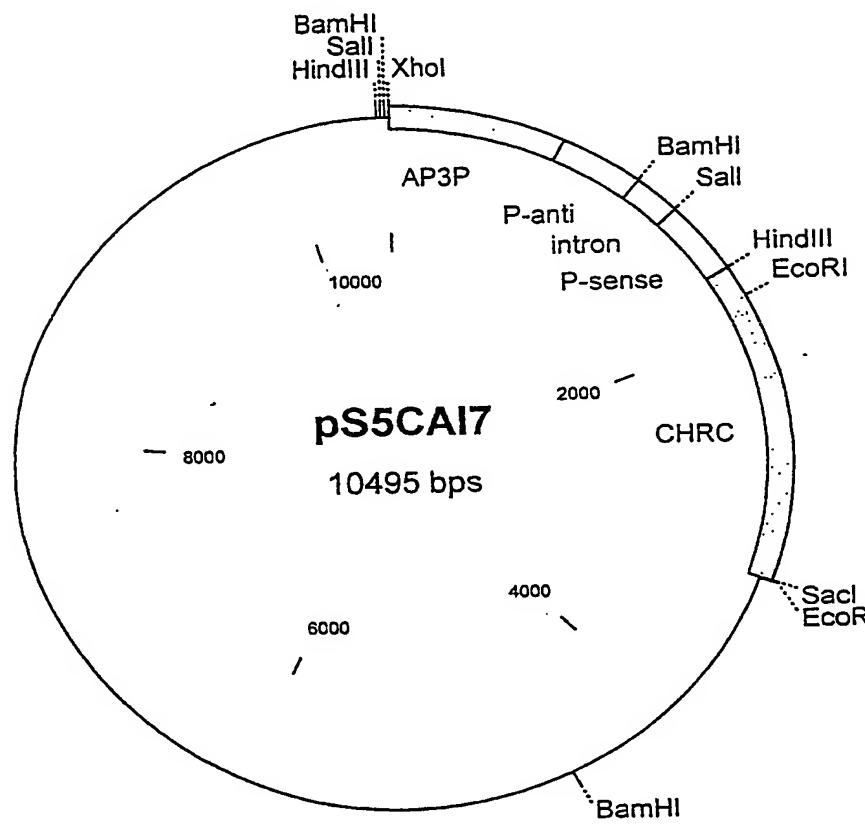
10

15

20

25

30



Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als
Futtermittel

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflan-
zenteilen der Gattung Tagetes oder astaxanthinhaltigen Extrakten von astaxanthinhaltigen
Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes zur oralen Verabreichung an Tiere, Verfahren
zur Herstellung von Tierfutterzubereitungen, die Tierfutterzubereitungen selbst, ein Verfahren

10 zum Pigmentieren von Tieren oder Tierprodukten sowie ein Verfahren zur Herstellung pigmen-
tierter Tiere und Tierprodukte.

Fischfutter.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH Co. KGaA

<120> Verwendung von astaxanthinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen der Gattung Tagetes als Futtermittel

<130> PF 54148

<160> 96

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1771

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1155)

<223>

<400> 1	ggcacgagct tgcacgcaag tcagcgcgca aagtcaaca cctgcccgtc cacagcctca	60
	aataataaaag agctcaagcg tttgtgcgcc tcgacgtggc cagtctgcac tgccttgaac	120
	ccgcgcgtct cccgcccgcac tgactgccat agcacagcta gacga atg cag cta gca	177
	Met Gln Leu Ala	
	1	
5	gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag	225
	Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys	
10	15	20
25	gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac gtg ttg cgt aca tgg	273
	Glu Lys Glu Lys Val Ala Gly Ser Ser Asp Val Leu Arg Thr Trp	
	30	35
40	gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gaa gag tca gac gcg gcc cgc ccg	321
	Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp Ala Ala Arg Pro	
	45	50
45	gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc gac aca aag ggc atc	369
	Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Ser Asp Thr Lys Gly Ile	

Fischfutter.ST25.txt
 55 60 65

aca atg gcg cta cgt gtc atc ggc tcc tgg gcc gca gtg ttc ctc cac	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	225	230	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	290	295	300	305	310	315	320	325	330	335	340	345	350	355	360	365	370	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430	435	440	445	450	455	460	465	470	475	480	485	490	495	500	505	510	515	520	525	530	535	540	545	550	555	560	565	570	575	580	585	590	595	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650	655	660	665	670	675	680	685	690	695	700	705	710	715	720	725	730	735	740	745	750	755	760	765	770	775	780	785	790	795	800	805	810	815	820	825	830	835	840	845	850	855	860	865	870	875	880	885	890	895	900	905	910	915	920	925	930	935	940	945	950	955	960	965	970	975	980	985	990	995	1000	1005	1010	1015	1020	1025	1030	1035	1040	1045	1050	1055	1060	1065	1070	1075	1080	1085	1090	1095	1100	1105	1110	1115	1120	1125	1130	1135	1140	1145	1150	1155	1160	1165	1170	1175	1180	1185	1190	1195	1200	1205	1210	1215	1220	1225	1230	1235	1240	1245	1250	1255	1260	1265	1270	1275	1280	1285	1290	1295	1300	1305	1310	1315	1320	1325	1330	1335	1340	1345	1350	1355	1360	1365	1370	1375	1380	1385	1390	1395	1400	1405	1410	1415	1420	1425	1430	1435	1440	1445	1450	1455	1460	1465	1470	1475	1480	1485	1490	1495	1500	1505	1510	1515	1520	1525	1530	1535	1540	1545	1550	1555	1560	1565	1570	1575	1580	1585	1590	1595	1600	1605	1610	1615	1620	1625	1630	1635	1640	1645	1650	1655	1660	1665	1670	1675	1680	1685	1690	1695	1700	1705	1710	1715	1720	1725	1730	1735	1740	1745	1750	1755	1760	1765	1770	1775	1780	1785	1790	1795	1800	1805	1810	1815	1820	1825	1830	1835	1840	1845	1850	1855	1860	1865	1870	1875	1880	1885	1890	1895	1900	1905	1910	1915	1920	1925	1930	1935	1940	1945	1950	1955	1960	1965	1970	1975	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2010	2015	2020	2025	2030	2035	2040	2045	2050	2055	2060	2065	2070	2075	2080	2085	2090	2095	2100	2105	2110	2115	2120	2125	2130	2135	2140	2145	2150	2155	2160	2165	2170	2175	2180	2185	2190	2195	2200	2205	2210	2215	2220	2225	2230	2235	2240	2245	2250	2255	2260	2265	2270	2275	2280	2285	2290	2295	2300	2305	2310	2315	2320	2325	2330	2335	2340	2345	2350	2355	2360	2365	2370	2375	2380	2385	2390	2395	2400	2405	2410	2415	2420	2425	2430	2435	2440	2445	2450	2455	2460	2465	2470	2475	2480	2485	2490	2495	2500	2505	2510	2515	2520	2525	2530	2535	2540	2545	2550	2555	2560	2565	2570	2575	2580	2585	2590	2595	2600	2605	2610	2615	2620	2625	2630	2635	2640	2645	2650	2655	2660	2665	2670	2675	2680	2685	2690	2695	2700	2705	2710	2715	2720	2725	2730	2735	2740	2745	2750	2755	2760	2765	2770	2775	2780	2785	2790	2795	2800	2805	2810	2815	2820	2825	2830	2835	2840	2845	2850	2855	2860	2865	2870	2875	2880	2885	2890	2895	2900	2905	2910	2915	2920	2925	2930	2935	2940	2945	2950	2955	2960	2965	2970	2975	2980	2985	2990	2995	3000	3005	3010	3015	3020	3025	3030	3035	3040	3045	3050	3055	3060	3065	3070	3075	3080	3085	3090	3095	3100	3105	3110	3115	3120	3125	3130	3135	3140	3145	3150	3155	3160	3165	3170	3175	3180	3185	3190	3195	3200	3205	3210	3215	3220	3225	3230	3235	3240	3245	3250	3255	3260	3265	3270	3275	3280	3285	3290	3295	3300	3305	3310	3315	3320	3325	3330	3335	3340	3345	3350	3355	3360	3365	3370	3375	3380	3385	3390	3395	3400	3405	3410	3415	3420	3425	3430	3435	3440	3445	3450	3455	3460	3465	3470	3475	3480	3485	3490	3495	3500	3505	3510	3515	3520	3525	3530	3535	3540	3545	3550	3555	3560	3565	3570	3575	3580	3585	3590	3595	3600	3605	3610	3615	3620	3625	3630	3635	3640	3645	3650	3655	3660	3665	3670	3675	3680	3685	3690	3695	3700	3705	3710	3715	3720	3725	3730	3735	3740	3745	3750	3755	3760	3765	3770	3775	3780	3785	3790	3795	3800	3805	3810	3815	3820	3825	3830	3835	3840	3845	3850	3855	3860	3865	3870	3875	3880	3885	3890	3895	3900	3905	3910	3915	3920	3925	3930	3935	3940	3945	3950	3955	3960	3965	3970	3975	3980	3985	3990	3995	4000	4005	4010	4015	4020	4025	4030	4035	4040	4045	4050	4055	4060	4065	4070	4075	4080	4085	4090	4095	4100	4105	4110	4115	4120	4125	4130	4135	4140	4145	4150	4155	4160	4165	4170	4175	4180	4185	4190	4195	4200	4205	4210	4215	4220	4225	4230	4235	4240	4245	4250	4255	4260	4265	4270	4275	4280	4285	4290	4295	4300	4305	4310	4315	4320	4325	4330	4335	4340	4345	4350	4355	4360	4365	4370	4375	4380	4385	4390	4395	4400	4405	4410	4415	4420	4425	4430	4435	4440	4445	4450	4455	4460	4465	4470	4475	4480	4485	4490	4495	4500	4505	4510	4515	4520	4525	4530	4535	4540	4545	4550	4555	4560	4565	4570	4575	4580	4585	4590	4595	4600	4605	4610	4615	4620	4625	4630	4635	4640	4645	4650	4655	4660	4665	4670	4675	4680	4685	4690	4695	4700	4705	4710	4715	4720	4725	4730	4735	4740	4745	4750	4755	4760	4765	4770	4775	4780	4785	4790	4795	4800	4805	4810	4815	4820	4825	4830	4835	4840	4845	4850	4855	4860	4865	4870	4875	4880	4885	4890	4895	4900	4905	4910	4915	4920	4925	4930	4935	4940	4945	4950	4955	4960	4965	4970	4975	4980	4985	4990	4995	5000	5005	5010	5015	5020	5025	5030	5035	5040	5045	5050	5055	5060	5065	5070	5075	5080	5085	5090	5095	5100	5105	5110	5115	5120	5125	5130	5135	5140	5145	5150	5155	5160	5165	5170	5175	5180	5185	5190	5195	5200	5205	5210	5215	5220	5225	5230	5235	5240	5245	5250	5255	5260	5265	5270	5275	5280	5285	5290	5295	5300	5305	5310	5315	5320	5325	5330	5335	5340	5345	5350	5355	5360	5365	5370	5375	5380	5385	5390	5395	5400	5405	5410	5415	5420	5425	5430	5435	5440	5445	5450	5455	5460	5465	5470	5475	5480	5485	5490	5495	5500	5505	5510	5515	5520	5525	5530	5535	5540	5545	5550	5555	5560	5565	5570	5575	5580	5585	5590	5595	5600	5605	5610	5615	5620	5625	5630	5635	5640	5645	5650	5655	5660	5665	5670	5675	5680	5685	5690	5695	5700	5705	5710	5715	5720	5725	5730	5735	5740	5745	5750	5755	5760	5765	5770	5775	5780	5785	5790	5795	5800	5805	5810	5815	5820	5825	5830	5835	5840	5845	5850	5855	5860	5865	5870	5875	5880	5885	5890	5895	5900	5905	5910	5915	5920	5925	5930	5935	5940	5945	5950	5955	5960	5965	5970	5975	5980	5985	5990	5995	6000	6005	6010	6015	6020	6025	6030	6035	6040	6045	6050	6055	6060	6065	6070	6075	6080	6085	6090	6095	6100	6105	6110	6115	6120	6125	6130	6135	6140	6145	6150	6155	6160	6165	6170	6175	6180	6185	6190	6195	6200	6205	6210	6215	6220	6225	6230	6235	6240	6245	6250	6255	6260	6265	6270	6275	6280	6285	6290	6295	6300	6305	6310	6315	6320	6325	6330	6335	6340	6345	6350	6355	6360	6365	6370	6375	6380	6385	6390	6395	6400	6405	6410	6415	6420	6425	6430	643
---	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-----

Fischfutter.ST25.txt

325

gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa agctgcaggc gctgctgccc 1245
gacacgctgc atggctacc ctgtgtagct gccgccacta ggggaggggg ttttagctg 1305
tcgagctgc cccatggatg aagctgtta gtggcagg gactacaccc acaggccaa 1365
acccttgca gagaatgtctt gcgtcgggag gactgttggg cagttagat gctatgatt 1425
tatcttaatg ctgaagcctt tagggagcg acacttagtgc tggcaggc aacgcccctgc 1485
aagggtcagg cacaagctag gctggacgag gactcggtgg caggcaggta aagaggtgcg 1545
ggaggggtggt gccacaccca ctggcaaga ccatgctgca atgctggcgg tgtggcagt 1605
agagctgcgt gattaactgg gctatggatt gttttagcag tctcacttat tctttgat 1665
agataactggt caggcaggta aggagagtga gtatgaacaa gttgagaggt ggtgcgcgtc 1725
ccctgcgcctt atgaagctgt aacaataaag tggttcaaaa aaaaaa 1771

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Arg Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Thr Ser Ser Leu Leu Asp Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
Seite 3

Fischfutter.ST25.txt

130

135

140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
325

<210> 3

<211> 1662

<212> DNA

<213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS

<222> (168)..(1130)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 3	cggggcaact caagaaattc aacagctgca agcgccccc agcctcacag cgccaagtga	60
gctatcgacg tggttgtgag cgctcgacgt ggtccactga cggccctgtg agcctctgcg		120
ctccgtcctc tgccaaatct cgcgtcgaaa cctgcctaag tcgaaga atg cac gtc		176
Met His Val		
1		
gca tcg gca cta atg gtc gag cag aaa ggc agt gag gca gct gct tcc		224
Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser		
5 10 15		
agc cca gac gtc ttg aga gcg tgg gcg aca cag tat cac atg cca tcc		272
Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser		
20 25 30 35		
gag tcg tca gac gca gct cgt cct gcg cta aag cac gcc tac aaa cct		320
Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro		
40 45 50		
cca gca tct gac gcc aag ggc atc acg atg gcg ctg acc atc att ggc		368
Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly		
55 60 65		
acc tgg acc gca gtg ttt tta cac gca ata ttt caa atc agg cta ccg		416
Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro		
70 75 80		
aca tcc atg gac cag ctt cac tgg ttg cct gtg tcc gaa gcc aca gcc		464
Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala		
85 90 95		
cag ctt ttg ggc gga agc agc agc cta ctg cac atc gct gca gtc ttc		512
Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe		
100 105 110 115		
att gta ctt gag ttc ctg tac act ggt cta ttc atc acc aca cat gac		560
Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp		
120 125 130		
gca atg cat ggc acc ata gct ttg agg cac agg cag ctc aat gat ctc		608
Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu		
135 140 145		
ctt ggc aac atc tgc ata tca ctg tac gcc tgg ttt gac tac agc atg		656
Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met		
150 155 160		
ctg cat cgc aag cac tgg gag cac cac aac cat act ggc gaa gtg ggg		704
Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly		
165 170 175		
aaa gac cct gac ttc cac aag gga aat ccc ggc ctt gtc ccc tgg ttc		752
Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe		
180 185 190 195		
gcc agc ttc atg tcc agc tac atg tcc ctg tgg cag ttt gcc cgg ctg		800
Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu		
200 205 210		
gca tgg tgg gca gtg gtg atg caa atg ctg ggg gcg ccc atg gca aat		848
Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn		
215 220 225		

Fischfutter.ST25.txt

ctc cta gtc ttc atg gct gca gcc cca atc ttg tca gca ttc cgc ctc	896
Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu	-
230 235 240	
ttc tac ttc ggc act tac ctg cca cac aag cct gag cca ggc cct gca	944
Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala	
245 250 255	
gca ggc tct cag gtg atg gcc tgg ttc agg gcc aag aca agt gag gca	992
Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala	
260 265 270 275	
tct gat gtg atg agt ttc ctg aca tgc tac cac ttt gac ctg cac tgg	1040
Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp	
280 285 290	
gag cac cac agg tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg cag ctg ccc cac tgc	1088
Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys	
295 300 305	
cgc cgc ctg tcc ggg cgt ggc ctg gtg cct gcc ttg gca tga	1130
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala	
310 315 320	
ctggccctt ccgcgtggta cccagcgctgc gacaaagagt gtcatgctac agggtgctgc	1190
ggccagtgcc agcgcagtgc actctcagcc tgtatggggc taccgctgtg ccactgagca	1250
ctggccatgc cactgagcac tggcgctgct actgagcaat gggcgtgcta ctgagcaatg	1310
ggcgtgctac tgacaatggg cgtgctactg gggctctggca gtggcttagga tggagtttga	1370
tgcattcagt agcggtgcc aacgtcatgt ggatggtgaa agtgctgagg ggtttaggca	1430
gccggcattt gagagggcta agttataaat cgcatgctgc tcatgcgcac atatctgcac	1490
acagccaggg aaatcccttc gagagtgatt atggacact tgtattggtt tcgtgctatt	1550
gttttattca gcagcgtac ttagtgaggg tgagagcagg gtggtgagag tggagtgtgat	1610
gagtatgaac ctggtcagcg aggtgaacag cctgtaatga atgactctgt ct	1662

<210> 4

<211> 320

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 4

Met His Val Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ser Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His
20 25 30

Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala
35 40 45

Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr

Fischfutter.ST25.txt

50 55 60
Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile
65 70 75 80
Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu
85 90 95
Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala
100 105 110
Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr
115 120 125
Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu
130 135 140
Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp
145 150 155 160
Tyr Ser Met Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly
165 170 175
Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val
180 185 190
Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe
195 200 205
Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro
210 215 220
Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala
225 230 235 240
Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro
245 250 255
Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr
260 265 270
Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp
275 280 285
Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu
290 295 300
Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala
305 310 315 320

Fischfutter.ST25.txt

<211> 729
<212> DNA
<213> *Agrobacterium aurantiacum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(729)

<223>

<400> 5 atg agc gca cat gcc ctg ccc aag gca gat ctg acc gcc acc agc ctg Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu 5 10 15	48
gtc tcg ggc ggc atc atc gcc gct tgg ctg gcc ctg cat gtg cat Ile Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His 20 25 30	96
gca ctg tgg ttt ctg gac gca gca gca cat ccc atc ctg gca atc gca Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala 35 40 45	144
aat ttc ctg ggg ctg acc tgg ctg tcg gtc gga ttg ttc atc atc gca Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala 50 55 60	192
cat gac gca atg cac ggg tcg gtc gtg gtg ccg ggg cgt ccg cgc gcc aat His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn 65 70 75 80	240
gca gca atg ggc cag ctt gtc ctg tgg ctg tat gcc gga ttt tcg tgg Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp 85 90 95	288
cgc aag atg atc gtc aag cac atg gcc cat cac cgc cat gcc gga acc Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His Arg His Ala Gly Thr 100 105 110	336
gac gac gac ccc gat ttc gac cat ggc ggc ccg gtc cgc tgg tac gcc Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala 115 120 125	384
cgc ttc atc ggc acc tat ttc ggc tgg cgc gag ggg ctg ctg ctg ccc Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro 130 135 140	432
gtc atc gtg acg gtc tat gca ctg atc ctt ggg gat cgc tgg atg tac Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr 145 150 155 160	480
gtc gtc ttc tgg ccg ctg ccg tcg atc ctg gca tcg atc cag ctg ttc Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe 165 170 175	528
gtc ttc ggc acc tgg ctg ccg cac cgc ccc ggc cac gac gca ttc ccg Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro 180 185 190	576

Fischfutter.ST25.txt

gac cgc cac aat gcg	cg	tcg	tcg	cg	atc	agc	ccc	gtg	tcg	ctg		624
Asp Arg His Asn Ala	Arg Ser Ser Arg Ile	Ser Asp Pro Val	Ser Leu									
195	200	205										
ctg acc tgc ttt cac	ttt	ggc	ggt	tat	cat	cac	gaa	cac	cac	ctg	cac	672
Leu Thr Cys Phe His	Phe His Gly	Gly Tyr His	Gly His Glu	His His	Leu His							
210	215	220										
ccg acg gtg ccg tgg	tgg	cg	ctg	ccc	agc	acc	cgc	acc	aag	ggg	gac	720
Pro Thr Val Pro Trp	Trp Arg Leu Pro Ser	Thr Arg Thr Lys	Gly Asp									
225	230	235	240									
acc gca tga												729
Thr Ala												

<210> 6
<211> 242
<212> PRT
<213> Agrobacterium aurantiacum

<400> 6
Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15
Ile Val Ser Gly Gly Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His
20 25 30
Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Ile Ala
35 40 45
Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60
His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80
Ala Ala Met Gly Glu Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95
Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr
100 105 110
Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
115 120 125
Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
130 135 140
Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
145 150 155 160

Fischfutter.ST25.txt

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
 180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 7

<211> 1631

<212> DNA

<213> Alcaligenes sp.

<220>

<221> CDS

<222> (99)..(827)

<223>

<400> 7
 caggccg ggcccggtgg ccaatggtcg caaccggcag gactggaaaca ggacggcgaaa 60
 cgggtctagg ctgtcgccct acgcagcagg agtttcgg atg tcc gga cgg aag cct 116
 Met Ser Gly Arg Lys Pro
 1 5
 ggc aca act ggc gac acg atc gtc aat ctc ggt ctg acc gcc gcg atc 164
 Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu Gly Leu Thr Ala Ala Ile
 10 15 20
 ctg ctg tgc tgg ctg gtc ctg cac gcc ttt acg cta tgg ttg cta gat 212
 Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe Thr Leu Trp Leu Leu Asp
 25 30 35
 gcg gcc gcg cat ccg ctg ctt gcc gtg ctg tgc ctg gct ggg ctg acc 260
 Ala Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu Cys Leu Ala Gly Leu Thr
 40 45 50
 tgg ctg tcg gtc ggg ctg ttc atc atc gcg cat gac gca atg cac ggg 308
 Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Ala Met His Gly
 55 60 65 70

Fischfutter.ST25.txt

tcc	gtg	gtg	ccg	ggg	cg	ccg	cg	gcc	aat	g	cg	g	cg	atc	gg	caa	ctg		356		
Ser	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Asn	Ala	Ala	Ile	Gly	Gln	Leu						
																	75	80	85		
g	cg	ctg	tgg	ctc	tat	g	cg	gg	ttc	tcg	tgg	cc	aag	ctg	atc	g	cc	aag		404	
Ala	Leu	Trp	Leu	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ser	Trp	Pro	Lys	Leu	Ile	Ala	Lys						
																	90	95	100		
c	ac	atg	ac	cat	cac	cg	cc	g	cc	gg	ac	cc	g	ac	at	cc	g	at	tt		452
His	Met	Thr	His	His	Arg	His	Ala	Gly	Thr	Asp	Asn	Asp	Pro	Asp	Phe						
																	105	110	115		
g	gt	ca	ga	gg	cc	gt	cg	tgg	ta	g	gc	ag	tc	gt	tc	cc	ac	ta		500	
Gly	His	Gly	Gly	Pro	Val	Arg	Trp	Tyr	Gly	Ser	Phe	Val	Ser	Thr	Tyr						
																	120	125	130		
t	tc	gg	tc	ga	ga	gg	ct	ct	ct	cc	gt	at	tc	ac	cc	ac	cc	ta		548	
Phe	Gly	Trp	Arg	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Val	Thr	Thr	Tyr						
																	135	140	145	150	
g	cg	ct	at	ct	gg	g	at	cg	tgg	at	tg	at	tc	tc	tgg	cc	gt			596	
Ala	Leu	Ile	Leu	Gly	Asp	Arg	Trp	Met	Tyr	Val	Ile	Phe	Trp	Pro	Val						
																	155	160	165		
cc	gc	gt	ct	g	cg	tc	at	ca	tt	tc	gt	tc	tt	gg	ac	at	tg	ct		644	
Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Gly	Ile	Phe	Val	Phe	Val	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu				
																	170	175	180		
cc	ca	cg	cc	gg	ca	ta	g	at	tt	cc	ga	cc	ca	ac	gg	ag			692		
Pro	His	Arg	Pro	Gly	His	Asp	Asp	Phe	Pro	Asp	Arg	His	Asn	Ala	Arg						
																	185	190	195		
tc	gc	atc	gg	g	ac	cc	tt	tca	ct	ct	acc	tc	tc	cat	tt				740		
Ser	Thr	Gly	Ile	Gly	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Phe	His	Phe						
																	200	205	210		
gg	gg	ta	ca	ca	ga	ca	ta	cg	ca	cc	ca	gt	cc	tg	cc	tg	tg		788		
Gly	Gly	Tyr	His	His	Glu	His	His	Leu	His	Pro	His	Val	Pro	Trp	Trp						
																	215	220	225	230	
cg	ct	c	cgt	aca	cg	aag	ac	gg	gg	cg	cg	gca	tga	cgcaattcct					837		
Arg	Leu	Pro	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	Gly	Gly	Arg	Ala										
																	235	240			
at	tg	cg	tg	gc	gc	tg	tg	tg	gg	ct	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc		897	
at	gc	ac	gg	cc	cc	cc	cc	cc		957											
gt	tt	gg	gg	aa	ac	cc	cc	cc	cc	cc		1017									
cg	tt	gg	gg	cc	cc	cc	cc	cc		1077											
gt	tt	gg	gg	cc	cc	cc	cc	cc		1137											
tcc	cg	cc	cc	gg	tt	cc	cc	cc	cc	cc		1197									
gg	gg	gg	gg	ac	ct	tg	cc	cc	cc	cc	cc		1257								
gc	agg	at	ct	gg	tt	cc	cc	cc	cc	cc		1317									
ga	tcc	cc	cc	gg	cc	cc	cc	cc	cc		1377										
gact	gt	cc	cc	gg	cc	cc	cc	cc	cc		1437										
gt	cc	cc	gg	gg	cc	cc	cc	cc	cc		1497										
act	gg	ct	gg	cc	cc	ct	ga	ag	cc	gg	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc		1557	

Fischfutter.ST25.txt

tcccagacca ttgcgcagg ctccggggcg gatatggctc gatgcacggg cgggggctga 1617
tgcgtgcggt gacc 1631

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Alcaligenes sp.

<400> 8

Met Ser Gly Arg Lys Pro Gly Thr Thr Gly Asp Thr Ile Val Asn Leu
1 5 10 15

Gly Leu Thr Ala Ala Ile Leu Leu Cys Trp Leu Val Leu His Ala Phe
20 25 30

Thr Leu Trp Leu Leu Asp Ala Ala His Pro Leu Leu Ala Val Leu
35 40 45

Cys Leu Ala Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala
50 55 60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn
65 70 75 80

Ala Ala Ile Gly Gln Leu Ala Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp
85 90 95

Pro Lys Leu Ile Ala Lys His Met Thr His His Arg His Ala Gly Thr
100 105 110

Asn Asp Pro Asp Phe Gly His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Gly
115 120 125

Ser Phe Val Ser Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
130 135 140

Val Ile Val Thr Thr Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
145 150 155 160

Val Ile Phe Trp Pro Val Pro Ala Val Leu Ala Ser Ile Gln Ile Phe
165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Asp Phe Pro
180 185 190

Asp Arg His Asn Ala Arg Ser Thr Gly Ile Gly Asp Pro Leu Ser Leu
195 200 205

Fischfutter.ST25.txt

130	135	140	
gtc atc gtg acg gtc tat	gcf ctg atc ctg ggg	gat cgc tgg atg tac	480
Val Ile Val Thr Val Tyr	Ala Leu Ile Leu Gly	Asp Arg Trp Met Tyr	
145	150	155	160
gtg gtc ttc tgg ccg ttg	ccg tcg atc ctg gcf tcg atc cag	ctg ttc	528
Val Val Phe Trp Pro Leu	Pro Ser Ile Leu Ala Ser	Ile Gln Leu Phe	
165	170	175	
gtg ttc ggc act tgg ctg	ccg cac cgc ccc ggc cac	gac gcf ttc ccg	576
Val Phe Gly Thr Trp Leu	Pro His Arg Pro Gly His	Asp Ala Phe Pro	
180	185	190	
gac cgc cat aat gcf cgf	tcg tcg cgg atc agc gac	cct gtg tcg ctg	624
Asp Arg His Asn Ala Arg	Ser Ser Arg Ile Ser Asp	Pro Val Ser Leu	
195	200	205	
ctg acc tgc ttt cat ttt	ggc ggt tat cat cac	gaa cac cac ctg cac	672
Leu Thr Cys Phe His Phe	Gly Gly Tyr His His	Glu His His Leu His	
210	215	220	
acg gtg ccg tgg tgg	ccg ctg ccc agc acc	cgf acc aag ggg gac	720
Thr Val Pro Trp Trp Arg	Leu Pro Ser Thr Arg Thr	Lys Gly Asp	
230	235	240	
acc gca tga			729
Thr Ala			

<210> 10

<211> 242

<212> PRT

<213> Paracoccus marcusii

<400> 10

Met Ser Ala His Ala Leu Pro Lys Ala Asp Leu Thr Ala Thr Ser Leu			
1	5	10	15

Val Ser Gly Gly Ile Ile Ala Ala Trp Leu Ala Leu His Val His		
20	25	30

Ala Leu Trp Phe Leu Asp Ala Ala Ala His Pro Ile Leu Ala Val Ala		
35	40	45

Asn Phe Leu Gly Leu Thr Trp Leu Ser Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala		
50	55	60

His Asp Ala Met His Gly Ser Val Val Pro Gly Arg Pro Arg Ala Asn			
65	70	75	80

Ala Ala Met Gly Gln Leu Val Leu Trp Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Trp		
85	90	95

Arg Lys Met Ile Val Lys His Met Ala His His Arg His Ala Gly Thr

Fischfutter.ST25.txt
 100 105 110

Asp Asp Asp Pro Asp Phe Asp His Gly Gly Pro Val Arg Trp Tyr Ala
 115 120 125

Arg Phe Ile Gly Thr Tyr Phe Gly Trp Arg Glu Gly Leu Leu Leu Pro
 130 135 140

Val Ile Val Thr Val Tyr Ala Leu Ile Leu Gly Asp Arg Trp Met Tyr
 145 150 155 160

Val Val Phe Trp Pro Leu Pro Ser Ile Leu Ala Ser Ile Gln Leu Phe
 165 170 175

Val Phe Gly Thr Trp Leu Pro His Arg Pro Gly His Asp Ala Phe Pro
 180 185 190

[REDACTED] Arg His Asn Ala Arg Ser Ser Arg Ile Ser Asp Pro Val Ser Leu
 195 200 205

Leu Thr Cys Phe His Phe Gly Gly Tyr His His Glu His His Leu His
 210 215 220

Pro Thr Val Pro Trp Trp Arg Leu Pro Ser Thr Arg Thr Lys Gly Asp
 225 230 235 240

Thr Ala

<210> 11

<211> 1629

<212> DNA

<213> Synechococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1629)

<223>

<400> 11
 atg atc acc acc gat gtt gtc att att ggg gcg ggg cac aat ggc tta
 Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
 1 5 10 15

gtc tgt gca gcc tat ttg ctc caa cgg ggc ttg ggg gtg acg tta cta
 Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
 20 25 30

48

96

Fischfutter.ST25.txt

gaa aag cgg gaa gta cca ggg ggg gcg gcc acc aca gaa gct ctc atg -	144
Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met	
35 40 45	
ccg gag cta tcc ccc cag ttt cgc ttt aac cgc tgt gcc att gac cac	192
Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His	
50 55 60	
gaa ttt atc ttt ctg ggg ccg gtg ttg cag gag cta aat tta gcc cag	240
Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln	
65 70 75 80	
tat ggt ttg gaa tat tta ttt tgt gac ccc agt gtt ttt tgt ccg ggg	288
Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly	
85 90 95	
ctg gat ggc caa gct ttt atg agc tac cgt tcc cta gaa aaa acc tgt	336
Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys	
100 105 110	
gcc cac att gcc acc tat agc ccc cga gat gcg gaa aaa tat cgg caa	384
Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln	
115 120 125	
gtc aat tat tgg acg gat ttg ctc aac gct gtc cag cct gct ttt	432
Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe	
130 135 140	
aat gct ccg ccc cag gct tta cta gat tta gcc ctg aac tat ggt tgg	480
Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp	
145 150 155 160	
gaa aac tta aaa tcc gtg ctg gcg atc gcc ggg tcg aaa acc aag gcg	528
Glu Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala	
165 170 175	
ttg gat ttt atc cgc act atg atc ggc tcc ccg gaa gat gtg ctc aat	576
Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn	
180 185 190	
gaa tgg ttc gac agc gaa cgg gtt aaa gct cct tta gct aga cta tgt	624
Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys	
195 200 205	
tcg gaa att ggc gct ccc cca tcc caa aag ggt agt agc tcc ggc atg	672
Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met	
210 215 220	
atg atg gtg gcc atg cgg cat ttg gag gga att gcc aga cca aaa gga	720
Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly	
225 230 235 240	
ggc act gga gcc ctc aca gaa gcc ttg gtg aag tta gtg caa gcc caa	768
Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln	
245 250 255	
ggg gga aaa atc ctc act gac caa acc gtc aaa cgg gta ttg gtg gaa	816
Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu	
260 265 270	
aac aac cag gcg atc ggg gtg gag gta gct aac gga gaa cag tac cgg	864
Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg	
275 280 285	
gcc aaa aaa ggc gtg att tct aac atc gat gcc cgc cgt tta ttt ttg	912
Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu	
290 295 300	

Fischfutter.ST25.txt

caa ttg gtg gaa ccg ggg gcc cta gcc aag gtg aat caa aac cta ggg Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly 305 310 315 320	960
gaa cga ctg gaa ccg cgc act gtg aac aat aac gaa gcc att tta aaa Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys 325 330 335 320	1008
atc gat tgt gcc ctc tcc ggt tta ccc cac ttc act gcc atg gcc ggg Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly 340 345 350 340	1056
ccg gag gat cta acg gga act att ttg att gcc gac tcg gta cgc cat Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His 355 360 365 355	1104
gtc gag gaa gcc cac gcc ctc att gcc ttg ggg caa att ccc gat gct Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala 370 375 380 370	1152
aat ccg tct tta tat ttg gat att ccc act gta ttg gac ccc acc atg Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met 385 390 395 400	1200
gcc ccc cct ggg cag cac acc ctc tgg atc gaa ttt ttt gcc ccc tac Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr 405 410 415 405	1248
cgc atc gcc ggg ttg gaa ggg aca ggg tta atg ggc aca ggt tgg acc Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr 420 425 430 420	1296
gat gag tta aag gaa aaa gtg gcg gat cgg gtg att gat aaa tta acg Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr 435 440 445 435	1344
gac tat gcc cct aac cta aaa tct ctg atc att ggt cgc cga gtg gaa Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu 450 455 460 450	1392
agt ccc gcc gaa ctg gcc caa cgg ctg gga agt tac aac ggc aat gtc Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val 465 470 475 465	1440
tat cat ctg gat atg agt ttg gac caa atg atg ttc ctc cgg cct cta Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu 485 490 495 485	1488
ccg gaa att gcc aac tac caa acc ccc atc aaa aat ctt tac tta aca Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr 500 505 510 500	1536
ggg gcg ggt acc cat ccc ggt ggc tcc ata tca ggt atg ccc ggt aga Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg 515 520 525 515	1584
aat tgc gct cgg gtc ttt tta aaa caa caa cgt cgt ttt tgg taa Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Phe Trp 530 535 540 530	1629

<210> 12

<211> 542

<212> PRT

<213> Synechococcus sp.

Fischfutter.ST25.txt

<400> 12

Met Ile Thr Thr Asp Val Val Ile Ile Gly Ala Gly His Asn Gly Leu
1 5 10 15

Val Cys Ala Ala Tyr Leu Leu Gln Arg Gly Leu Gly Val Thr Leu Leu
20 25 30

Glu Lys Arg Glu Val Pro Gly Gly Ala Ala Thr Thr Glu Ala Leu Met
35 40 45

Pro Glu Leu Ser Pro Gln Phe Arg Phe Asn Arg Cys Ala Ile Asp His
50 55 60

Glu Phe Ile Phe Leu Gly Pro Val Leu Gln Glu Leu Asn Leu Ala Gln
70 75 80

Tyr Gly Leu Glu Tyr Leu Phe Cys Asp Pro Ser Val Phe Cys Pro Gly
85 90 95

Leu Asp Gly Gln Ala Phe Met Ser Tyr Arg Ser Leu Glu Lys Thr Cys
100 105 110

Ala His Ile Ala Thr Tyr Ser Pro Arg Asp Ala Glu Lys Tyr Arg Gln
115 120 125

Phe Val Asn Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Asn Ala Val Gln Pro Ala Phe
130 135 140

Asn Ala Pro Pro Gln Ala Leu Leu Asp Leu Ala Leu Asn Tyr Gly Trp
145 150 155 160

Asn Asn Leu Lys Ser Val Leu Ala Ile Ala Gly Ser Lys Thr Lys Ala
165 170 175

Leu Asp Phe Ile Arg Thr Met Ile Gly Ser Pro Glu Asp Val Leu Asn
180 185 190

Glu Trp Phe Asp Ser Glu Arg Val Lys Ala Pro Leu Ala Arg Leu Cys
195 200 205

Ser Glu Ile Gly Ala Pro Pro Ser Gln Lys Gly Ser Ser Ser Gly Met
210 215 220 240

Met Met Val Ala Met Arg His Leu Glu Gly Ile Ala Arg Pro Lys Gly
225 230 235 240

Gly Thr Gly Ala Leu Thr Glu Ala Leu Val Lys Leu Val Gln Ala Gln
245 250 255

Fischfutter.ST25.txt

Gly Gly Lys Ile Leu Thr Asp Gln Thr Val Lys Arg Val Leu Val Glu
260 265 270

Asn Asn Gln Ala Ile Gly Val Glu Val Ala Asn Gly Glu Gln Tyr Arg
275 280 285

Ala Lys Lys Gly Val Ile Ser Asn Ile Asp Ala Arg Arg Leu Phe Leu
290 295 300

Gln Leu Val Glu Pro Gly Ala Leu Ala Lys Val Asn Gln Asn Leu Gly
305 310 315 320

Glu Arg Leu Glu Arg Arg Thr Val Asn Asn Glu Ala Ile Leu Lys
325 330 335

Ile Asp Cys Ala Leu Ser Gly Leu Pro His Phe Thr Ala Met Ala Gly
340 345 350

Pro Glu Asp Leu Thr Gly Thr Ile Leu Ile Ala Asp Ser Val Arg His
355 360 365

Val Glu Glu Ala His Ala Leu Ile Ala Leu Gly Gln Ile Pro Asp Ala
370 375 380

Asn Pro Ser Leu Tyr Leu Asp Ile Pro Thr Val Leu Asp Pro Thr Met
385 390 395 400

Ala Pro Pro Gly Gln His Thr Leu Trp Ile Glu Phe Phe Ala Pro Tyr
405 410 415

Arg Ile Ala Gly Leu Glu Gly Thr Gly Leu Met Gly Thr Gly Trp Thr
420 425 430

Asp Glu Leu Lys Glu Lys Val Ala Asp Arg Val Ile Asp Lys Leu Thr
435 440 445

Asp Tyr Ala Pro Asn Leu Lys Ser Leu Ile Ile Gly Arg Arg Val Glu
450 455 460

Ser Pro Ala Glu Leu Ala Gln Arg Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Asn Val
465 470 475 480

Tyr His Leu Asp Met Ser Leu Asp Gln Met Met Phe Leu Arg Pro Leu
485 490 495

Pro Glu Ile Ala Asn Tyr Gln Thr Pro Ile Lys Asn Leu Tyr Leu Thr
500 505 510

Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Met Pro Gly Arg
515 520 525

Fischfutter.ST25.txt

Asn Cys Ala Arg Val Phe Leu Lys Gln Gln Arg Arg Arg Phe Trp
 530 535 540

<210> 13

<211> 776

<212> DNA

<213> *Bradyrhizobium* sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(774)

<223>

<400> 13		
atg cat gca gca acc gcc aag gct act gag ttc ggg gcc tct cgg cgc		48
Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg		
1 5 10 15		
gac gat gcg agg cag cgc cgc gtc ggt ctc acg ctg gcc gcg gtc atc		96
Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile		
20 25 30		
atc gcc gcc tgg ctg gtg ctg cat gtc ggt ctg atg ttc ttc tgg ccg		144
Ile Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro		
35 40 45		
ctg acc ctt cac agc ctg ctg ccg gct ttg cct ctg gtg gtg ctg cag		192
Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln		
50 55 60		
acc tgg ctc tat gta ggc ctg ttc atc atc gcg cat gac tgc atg cac		240
Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His		
65 70 75 80		
tcg ctg gtg ccg ttc aag ccg cag gtc aac cgc cgt atc gga cag		288
Leu Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln		
85 90 95		
ctc tgc ctg ttc ctc tat gcc ggg ttc tcc ttc gac gct ctc aat gtc		336
Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val		
100 105 110		
gag cac cac aag cat cac cgc cat ccc ggc acg gcc gag gat ccc gat		384
Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp		
115 120 125		
ttc gac gag gtg ccg ccg cac ggc ttc tgg cac tgg ttc gcc agc ttt		432
Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe		
130 135 140		
ttc ctg cac tat ttc ggc tgg aag cag gtc gcg atc atc gca gcc gtc		480
Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val		
145 150 155 160		
tcg ctg gtt tat cag ctc gtc ttc gcc gtt ccc ttg cag aac atc ctg		528
Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu		

Fischfutter.ST25.txt

165	170	175	
ctg ttc tgg gcg ctg ccc ggg ctg ctg tcg gcg ctg cag ctg ttc acc			576
Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr			
180	185	190	
ttc ggc acc tat ctg ccg cac aag ccg gcc acg cag ccc ttc gcc gat			624
Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp			
195	200	205	
cgc cac aac gcg cgg acg agc gaa ttt ccc gcg tgg ctg tcg ctg ctg			672
Arg His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu			
210	215	220	
acc tgc ttc cac ttc ggc ttt cat cac gag cat cat ctg cat ccc gat			720
Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp			
225	230	235	240
gcg ccg tgg tgg cgg ctg ccg gag atc aag cgg cgg gcc ctg gaa agg			768
Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg			
245	250	255	
776			

sgt gac ta
g Asp

<210> 14
<211> 258
<212> PRT
<213> *Bradyrhizobium* sp.

<400> 14
Met His Ala Ala Thr Ala Lys Ala Thr Glu Phe Gly Ala Ser Arg Arg
1 5 10 15

Asp Asp Ala Arg Gln Arg Arg Val Gly Leu Thr Leu Ala Ala Val Ile
20 25 30

Ala Ala Trp Leu Val Leu His Val Gly Leu Met Phe Phe Trp Pro
35 40 45

Leu Thr Leu His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Gln
50 55 60

Thr Trp Leu Tyr Val Gly Leu Phe Ile Ile Ala His Asp Cys Met His
65 70 75 80

Gly Ser Leu Val Pro Phe Lys Pro Gln Val Asn Arg Arg Ile Gly Gln
85 90 95

Leu Cys Leu Phe Leu Tyr Ala Gly Phe Ser Phe Asp Ala Leu Asn Val
100 105 110

Glu His His Lys His His Arg His Pro Gly Thr Ala Glu Asp Pro Asp
Seite 21

Fischfutter.ST25.txt
 115 120 125

Phe Asp Glu Val Pro Pro His Gly Phe Trp His Trp Phe Ala Ser Phe
 130 135 140

Phe Leu His Tyr Phe Gly Trp Lys Gln Val Ala Ile Ile Ala Ala Val
 145 150 155 160

Ser Leu Val Tyr Gln Leu Val Phe Ala Val Pro Leu Gln Asn Ile Leu
 165 170 175

Leu Phe Trp Ala Leu Pro Gly Leu Leu Ser Ala Leu Gln Leu Phe Thr
 180 185 190

Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Ala Thr Gln Pro Phe Ala Asp
 195 200 205

His Asn Ala Arg Thr Ser Glu Phe Pro Ala Trp Leu Ser Leu Leu
 210 215 220

Thr Cys Phe His Phe Gly Phe His His Glu His His Leu His Pro Asp
 225 230 235 240

Ala Pro Trp Trp Arg Leu Pro Glu Ile Lys Arg Arg Ala Leu Glu Arg
 245 250 255

Arg Asp

<210> 15

<211> 777

<212> DNA

<213> Nostoc sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 15
 atg gtt cag tgt caa cca tca tct ctg cat tca gaa aaa ctg gtg tta
 Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
 1 5 10 15

48

ttg tca tcg aca atc aga gat gat aaa aat att aat aag ggt ata ttt
 Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
 20 25 30

96

Fischfutter.ST25.txt

att gcc tgc ttt atc tta ttt tta tgg gca att agt tta atc tta tta Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu- 35 40 45	144
ctc tca ata gat aca tcc ata att cat aag agc tta tta ggt ata gcc Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Ser Leu Leu Gly Ile Ala 50 55 60	192
atg ctt tgg cag acc ttc tta tat aca ggt tta ttt att act gct cat Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His 65 70 75 80	240
gat gcc atg cac ggc gta gtt tat ccc aaa aat ccc aga ata aat aat Asp Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn 85 90 95	288
ttt ata ggt aag ctc act cta atc ttg tat gga cta ctc cct tat aaa Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys 100 105 110	336
gat tta ttg aaa aaa cat tgg tta cac cac gga cat cct ggt act gat Asp Leu Leu Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp 115 120 125	384
gac cct gat tat tac aat ggt cat ccc caa aac ttc ttt ctt tgg Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Leu Trp 130 135 140	432
tat cta cat ttt atg aag tct tat tgg cga tgg acg caa att ttc gga Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly 145 150 155 160	480
tta gtg atg att ttt cat gga ctt aaa aat ctg gtg cat ata cca gaa Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu 165 170 175	528
aat aat tta att ata ttt tgg atg ata cct tct att tta agt tca gta Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val 180 185 190	576
caa cta ttt tat ttt ggt aca ttt ttg cct cat aaa aag cta gaa ggt Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly 195 200 205	624
ggt tat act aac ccc cat tgt gcg cgc agt atc cca tta cct ctt ttt Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe 210 215 220	672
ggc tct ttt gtt act tgt tat cac ttc ggc tac cac aag gaa cat cac Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His 225 230 235 240	720
gaa tac cct caa ctt cct tgg tgg aaa tta cct gaa gct cac aaa ata Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile 245 250 255	768
tct tta taa Ser Leu	777

<210> 16

<211> 258

<212> PRT

<213> Nostoc sp.

Fischfutter.ST25.txt

<400> 16

Met Val Gln Cys Gln Pro Ser Ser Leu His Ser Glu Lys Leu Val Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Thr Ile Arg Asp Asp Lys Asn Ile Asn Lys Gly Ile Phe
20 25 30

Ile Ala Cys Phe Ile Leu Phe Leu Trp Ala Ile Ser Leu Ile Leu Leu
35 40 45

Leu Ser Ile Asp Thr Ser Ile Ile His Lys Ser Leu Leu Gly Ile Ala
50 55 60

Met Leu Trp Gln Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His
65 70 75 80

Ala Met His Gly Val Val Tyr Pro Lys Asn Pro Arg Ile Asn Asn
85 90 95

Phe Ile Gly Lys Leu Thr Leu Ile Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Lys
100 105 110

Asp Leu Leu Lys Lys His Trp Leu His His Gly His Pro Gly Thr Asp
115 120 125

Leu Asp Pro Asp Tyr Tyr Asn Gly His Pro Gln Asn Phe Phe Leu Trp
130 135 140

Tyr Leu His Phe Met Lys Ser Tyr Trp Arg Trp Thr Gln Ile Phe Gly
145 150 155 160

Leu Val Met Ile Phe His Gly Leu Lys Asn Leu Val His Ile Pro Glu
165 170 175

Asn Asn Leu Ile Ile Phe Trp Met Ile Pro Ser Ile Leu Ser Ser Val
180 185 190

Gln Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Lys Lys Leu Glu Gly
195 200 205

Gly Tyr Thr Asn Pro His Cys Ala Arg Ser Ile Pro Leu Pro Leu Phe
210 215 220

Trp Ser Phe Val Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Lys Glu His His
225 230 235 240

Glu Tyr Pro Gln Leu Pro Trp Trp Lys Leu Pro Glu Ala His Lys Ile
245 250 255

Fischfutter.ST25.txt

Ser Leu

<210> 17
 <211> 1608
 <212> DNA
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>

<221> CDS
 <222> (3)..(971)
 <223>

<200> 17	47
ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc	
Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile	
1 5 10 15	
ggc cca cct cct cat ctc cat cgg tca ttt gct gct acc acg atg ctg	95
Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu	
20 25 30	
tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc gtc gaa cta gcc	143
Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala	
35 40 45	
cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg	191
Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser	
50 55 60	
tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gca ctg gga	239
Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly	
65 70 75	
gtg cag gct gcc ggc ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca	287
Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala	
85 90 95	
ctc cag cag ctt gac cgg gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa	335
Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys	
100 105 110	
cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc att gca gca tca att ggc	383
Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly	
115 120 125	
gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac	431
Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His	
130 135 140	
atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc	479
Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu	
145 150 155	
ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat	527
Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr	

Fischfutter.ST25.txt

160	165	170	175	
gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac				575
Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His				
180	185		190	
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg				623
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu				
195	200		205	
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc				671
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly				
210	215		220	
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg				719
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu				
225	230		235	
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg				767
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu				
240	245		250	
ctg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg				815
His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met				
260	265		270	
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt				863
Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly				
275	280		285	
ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att				911
Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile				
290	295		300	
cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg				959
Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp				
305	310		315	
tcc aag cgg tag ggtgcggAAC caggcacgCT ggtttcacAC ctcatgcctG				1011
Ser Lys Arg				
320				
tgataaggtg tggctagagc gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggtcg actggctga				1071
tggccaatgg catcggccat gtctggcat cacgggctgg ttgcctgggt gaaggtgatg				1131
atcatca tgtgcggttg gaggggctgg cacagtgtgg gctgaactgg agcagttgtc				1191
ggctggcg ttgaatcagt gagggtttgt gattggcggt tgtgaagcaa tgactccgcc				1251
catattctat ttgtgggagc tgagatgatg gcatgcttgg gatgtgcattg gatcatggta				1311
gtgcagcaaa ctatattcac ctagggctgt tggtaggatc aggtgaggcc ttgcacattg				1371
catgatgtac tcgtcatggt gtgttggta gaggatggat gtggatggat gtgtattctc				1431
agacgttagac cttgactgga ggcttgatcg agagagtggg ccgtattctt tgagagggga				1491
ggctcggtgcc agaaatggtg agtggatgac tgtgacgctg tacattgcag gcaggtgaga				1551
tgcactgtct cgattgtaaa atacattcag atgcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa				1608

<210> 18

<211> 322

<212> PRT

Fischfutter.ST25.txt

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 18

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
50 55 60

Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
70 75 80

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu
85 90 95

Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
100 105 110

Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
115 120 125

Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
130 135 140

Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
145 150 155 160

Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
165 170 175

His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
180 185 190

Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
195 200 205

Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe
210 215 220

Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly
225 230 235 240

Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val
Seite 27

His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys
 260 265 270

Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly
 275 280 285

Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro
 290 295 300

Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser
 305 310 315 320

Lys Arg

<210> 19

<211> 1503

<212> DNA

<213> Tomate

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 19
 atg gat act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
 5 10 15

cat cat ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat
 His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
 20 25 30

cat aat ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt
 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
 35 40 45

tgt gtt aag ggt agt agt agt gct ctt tta gag ctt gta cct gag acc
 Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
 50 55 60

aaa aag gag aat ctt gat ttt gag ctt cct atg tat gac cct tca aaa
 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
 65 70 75 80

ggg gtt gtt gtg gat ctt gct gtg gtt ggt ggt ggc cct gca gga ctt
 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
 85 90 95

48

96

144

192

240

288

Fischfutter.ST25.txt

gct gtt gca cag caa gtt tct gaa gca gga ctc tct gtt tgg tca att	336
Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile	
100 105 110	
gat ccc aat cct aaa ttg ata tgg cct aat aac tat ggt gtt tgg gtg	384
Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val	
115 120 125	
gat gaa ttt gag gct atg gac ttg tta gat tgg cta gat gct acc tgg	432
Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp	
130 135 140	
tct ggt gca gca gtg tac att gat gat aat acg gct aaa gat ctt cat	480
Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His	
145 150 155 160	
aga cct tat gga agg gtt aac cgg aaa cag ctg aaa tcg aaa atg atg	528
Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met	
165 170 175	
cag aaa tgt ata atg aat ggt gtt aaa ttc cac caa gcc aaa gtt ata	576
Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile	
180 185 190	
ggt gtg att cat gag gaa tcg aaa tcc atg ttg ata tgc aat gat ggt	624
Asp Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly	
195 200 205	
att act att cag gca acg gtg gtg ctc gat gca act ggc ttc tct aga	672
Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg	
210 215 220	
tct ctt gtt cag tat gat aag cct tat aac ccc ggg tat caa gtt gct	720
Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala	
225 230 235 240	
tat ggc att ttg gct gaa gtg gaa gag cac ccc ttt gat gta aac aag	768
Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys	
245 250 255	
atg gtt ttc atg gat tgg cga gat tct cat ttg aag aac aat act gat	816
Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp	
260 265 270	
ctc aag gag aga aat agt aga ata cca act ttt ctt tat gca atg cca	864
Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
275 280 285	
ttt tca tcc aac agg ata ttt ctt gaa gaa aca tca ctc gta gct cgt	912
Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg	
290 295 300	
cct ggc ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta	960
Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu	
305 310 315 320	
aac cat ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt	1008
Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys	
325 330 335	
cta ata cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt	1056
Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val	
340 345 350	
gga atc ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg	1104
Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met	
355 360 365	

Fischfutter.ST25.txt

gtg gca agg aca cta gct gcg gct cct gtt gcc aat gcc ata att	1152
Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile	
370 375 380	
caa tac ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca	1200
Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr	
385 390 395 400	
gct gtt tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag	1248
Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu	
405 410 415	
ttc ttc tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct	1296
Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala	
420 425 430	
aca aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg	1344
Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp	
435 440 445	
cat ggc ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt	1392
His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe	
450 455 460	
ctg tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata	1440
Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile	
465 470 475 480	
atg aca aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta	1488
Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu	
485 490 495	
cag gat aaa gaa tga	1503
Gln Asp Lys Glu	
500	

<210> 20

<211> 500

<212> PRT

<213> Tomate

<210> 20

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro
1 5 10 15

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30

His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45

Cys Val Lys Gly Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
50 55 60

Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80

Fischfutter.ST25.txt

Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu-
85 90 95

Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
115 120 125

Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
130 135 140

Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
145 150 155 160

Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
165 170 175

Arg Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
180 185 190

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
195 200 205

Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
210 215 220

Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
225 230 235 240

Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
245 250 255

Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
260 265 270

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro
275 280 285

Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg
290 295 300

Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu
305 310 315 320

Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys
325 330 335

Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val
340 345 350

Fischfutter.ST25.txt

Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met
355 360 365

Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile
370 375 380

Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr
385 390 395 400

Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu
405 410 415

Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala
420 425 430

Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp
435 440 445

As Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe
450 455 460

Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile
465 470 475 480

Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu
485 490 495

Gln Asp Lys Glu
500

<210> 21

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(195)

<223>

<400> 21
tacgtaagtt tctgcttctta cctttgatata atatataata attatcatta attagtagta 60
atataatattt tcaaataatattt ttttcaaaaat aaaagaatgt agtataatgc aattgctttt 120
ctgttagttta taagtgtgta tatttttaattt tataactttt ctaatataatg accaaaattt 180

gtt gat gtgc agctg

<210> 22
<211> 1155
<212> DNA
<213> *Haematococcus pluvialis*

<220>
<221> CDS
<222> (6)..(995)
<223>

00> 22
 agc atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc 50
 Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser
 1 5 10 15
 gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac 98
 Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp
 20 25 30
 gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca 146
 Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser
 35 40 45
 gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc 194
 Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser
 50 55 60
 gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gcc 242
 Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala
 65 70 75
 gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg 290
 Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu
 85 90 95
 gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt 338
 Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val
 100 105 110
 agc ggc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg 386
 Ser Gly Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu
 115 120 125
 gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat 434
 Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His
 130 135 140
 ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga 482
 Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg
 145 150 155
 gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc 530
 Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg
 160 165 170 175

Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct	578
Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro	
180 185 190	
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc	626
Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe	
195 200 205	
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg	674
Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp	
210 215 220	
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg	722
Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val	
225 230 235	
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt	770
Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe	
240 245 250 255	
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct	818
Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser	
260 265 270	
cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc	866
Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser	
275 280 285	
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag	914
Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu	
290 295 300	
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc	962
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg	
305 310 315	
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac tgcagtggc	1015
Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala	
320 325	
cctgctgcca gctggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtaaaa agctgcaggc	1075
gctgctgccc gacacgctgc atggctacc ctgtgttagct gccgccacta ggggaggggg	1135
ttttagctg tcgagcttgc	1155

<210> 23

<211> 329

<212> PRT

<213> *Haematococcus pluvialis*

<400> 23

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
Seite 34

35

Fischfutter.ST25.txt
40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
Seite 35

Fischfutter.ST25.txt

cac cgc aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys 160 165 170 175	528
gac cct gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc Asp Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala 180 185 190	576
agc ttc atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala 195 200 205	624
tgg tgg acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg Trp Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu 210 215 220	672
ctg gtg ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe 225 230 235	720
tac ttt ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca Tyr Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser 240 245 250 255	768
tct tca cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln 260 265 270	816
gcg tcc gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac Ala Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His 275 280 285	864
tgg gag cac cac cgc tgg ccc ttc gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn 290 295 300	912
tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc tag ctggacacac Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala 305 310 315	961
tgcagtgggc cctgctgcca gctgggcatg caggttgtgg caggactggg tgaggtgaaa	1021
agctgcaggc gctgctgccg gacacgttgc atggctacc ctgtgtagct gccgccacta	1081
ggggagggggg tttgttagctg tcgagcttgc	1111

<20> 25

<211> 315

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 25

Met Leu Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser
1 5 10 15

Asp Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu
20 25 30

Ser Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro
Seite 37

Ser Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp
 50 55 60

Ala Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser
 65 70 75 80

Leu Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu
 85 90 95

Val Ser Gly Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val
 100 105 110

Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met
 115 120 125

As Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly
 130 135 140

Arg Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His
 145 150 155 160

Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp
 165 170 175

Pro Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser
 180 185 190

Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp
 195 200 205

Trp Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu
 210 215 220

Ile Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr
 225 230 235 240

Phe Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly
 245 250 255

Ser Ser Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala
 260 265 270

Ser Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp
 275 280 285

Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys
 290 295 300

Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala

<210> 26
 <211> 1031
 <212> DNA
 <213> Haematococcus pluvialis

<220>
 <221> CDS
 <222> (6)..(1031)
 <223>

100>	26		50
atgc	atg cag cta gca gcg aca gta atg ttg gag cag ctt acc gga agc		
1	Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser	10	15
	5		
gct gag gca ctc aag gag aag gag aag gag gtt gca ggc agc tct gac			98
Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp	20	25	30
gtg ttg cgt aca tgg gcg acc cag tac tcg ctt ccg tca gag gag tca			146
Val Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser	35	40	45
gac gcg gcc cgc ccg gga ctg aag aat gcc tac aag cca cca cct tcc			194
Asp Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser	50	55	60
gac aca aag ggc atc aca atg gcg cta gct gtc atc ggc tcc tgg gct			242
Asp Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala	65	70	75
gca gtg ttc ctc cac gcc att ttt caa atc aag ctt ccg acc tcc ttg			290
Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu	85	90	95
gac cag ctg cac tgg ctg ccc gtg tca gat gcc aca gct cag ctg gtt			338
Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val	100	105	110
agc ggc agc agc agc ctg ctg cac atc gtc gta gta ttc ttt gtc ctg			386
Ser Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu	115	120	125
gag ttc ctg tac aca ggc ctt ttt atc acc acg cat gat gct atg cat			434
Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His	130	135	140
ggc acc atc gcc atg aga aac agg cag ctt aat gac ttc ttg ggc aga			482
Gly Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg	145	150	155
gta tgc atc tcc ttg tac gcc tgg ttt gat tac aac atg ctg cac cgc			530
Val Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg	160	165	170
			175

Fischfutter.ST25.txt

aag cat tgg gag cac cac aac cac act ggc gag gtg ggc aag gac cct Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro 180 185 190	578
gac ttc cac agg gga aac cct ggc att gtg ccc tgg ttt gcc agc ttc Asp Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe 195 200 205	626
atg tcc agc tac atg tcg atg tgg cag ttt gcg cgc ctc gca tgg tgg Met Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp 210 215 220	674
acg gtg gtc atg cag ctg ctg ggt gcg cca atg gcg aac ctg ctg gtg Thr Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val 225 230 235	722
ttc atg gcg gcc gcg ccc atc ctg tcc gcc ttc cgc ttg ttc tac ttt Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe 240 245 250 255	770
ggc acg tac atg ccc cac aag cct gag cct ggc gcc gcg tca ggc tct Gly Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser 260 265 270	818
aa cca gcc gtc atg aac tgg tgg aag tcg cgc act agc cag gcg tcc Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser 275 280 285	866
gac ctg gtc agc ttt ctg acc tgc tac cac ttc gac ctg cac tgg gag Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu 290 295 300	914
cac cac cgc tgg ccc ttt gcc ccc tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg 305 310 315	962
cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt cct gcc gag caa aaa ctc atc tca Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser 320 325 330 335	1010
gaa gag gat ctg aat agc tag Glu Glu Asp Leu Asn Ser 340	1031

<210> 27

11> 341

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 27

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
35 40 45

Fischfutter.ST25.txt

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
130 135 140

Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
180 185 190

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
305 310 315 320

Fischfutter.ST25.txt

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
325 330 335

Glu Asp Leu Asn Ser
340

<210> 28
<211> 777
<212> DNA
<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(777)
<223>

<400> 28
gagctcactc actgatttcc attgcttcaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa ctttagtttg aaacaacact aactggtcga 120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tccttaacttg tgattccttc ttaaacccta 240
ggggtaatat tctatttcc aaggatctt agttaaaggc aaatccggga aattattgtt 300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gtttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360
tatatatctc tttcttctta tttcccaaatt taacagacaa aagtagata ttggctttta 420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttgc tttacttttag ggtaagtgc 480
aagccaaac caaatccacc tgcaactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540
gttgattt aaacagtgtc ttgtatattaa aaaaatcagt ttacataat gaaaaattta 600
tcacttagtt ttcataact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctctt ctatccact 720
tctttcttct cattataatct ctgtccctct ccaccaaatac tcttcaacaa aaagctt 777

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>

Fischfutter.ST25.txt

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 29
gcaagctcga cagctacaaa cc

22

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> kuenstlich

20>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 30
gaagcatgca gctaggcagcg acag

24

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstlich

20>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 31
tgcatgctag aggcaactcaa ggagaaggag

30

<210> 32

<211> 59

<212> DNA

<213> kuenstlich

Fischfutter.ST25.txt

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(59)
<223>

<400> 32
ctagctattc agatcctctt ctgagatgag ttttgctcg gcaggaacca gacctcgcc 59

<210> 33
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 33
gagctcaactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 34
<211> 37
<212> DNA
<213> kuenstlich

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(37)
<223>

<400> 34
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 35
<211> 34

Fischfutter.ST25.txt

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 35 atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstlich

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 36 taagcttttt gttgaagaga tttgg 25

<210> 37

<211> 212

<212> DNA

<213> Kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(212)

<223>

<400> 37 gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60

Fischfutter.ST25.txt

gtagtaatat aatatttcaa atatttttt caaaaataaaa gaatgttagta tatagcaatt	120
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca	180
aaatttgttg atgtgcaggt atcaccggat cc	212
<210> 38	
<211> 1830	
<212> DNA	
<213> Tagetes erecta	
<220>	
<221> CDS	
<222> (141)..(1691)	
<23>	
<400> 38 ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggta gagacactcc aatccaaaca gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr 1 5 10	60 120 173
atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr 15 20 25	221
aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln 30 35 40	269
gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu 45 50 55	317
at ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc Leu Phe Val Gln Met Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser 60 65 70 75	365
cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gac agt Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Asp Ser 80 85 90	413
aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu 95 100 105	461
gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile 110 115 120	509
ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu 125 130 135	557

Fischfutter.ST25.txt

ttt	ata	ggt	ctt	gga	ctt	gag	ggc	tgt	att	gaa	cat	gtt	tgg	cga	gat	605
Phe	Ile	Gly	Leu	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Ile	Glu	His	Val	Trp	Arg	Asp	
140			145							150					155	
act	gta	gta	tat	ctt	gat	gac	aac	gat	ccc	att	ctc	ata	ggt	cgt	gcc	653
Thr	Val	Val	Tyr	Leu	Asp	Asp	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	
				160					165				170			
tat	gga	cga	gtt	agt	cgt	gat	tta	ctt	cac	gag	gag	ttg	ttg	act	agg	701
Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Thr	Arg	
				175				180				185				
tgc	atg	gag	tca	ggc	gtt	tca	tat	ctg	agc	tcc	aaa	gtg	gaa	cgg	att	749
Cys	Met	Glu	Ser	Gly	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	
				190				195				200				
act	gaa	gct	cca	aat	ggc	cta	agt	ctc	ata	gag	tgt	gaa	ggc	aat	atc	797
Thr	Glu	Ala	Pro	Asn	Gly	Leu	Ser	Leu	Ile	Glu	Cys	Glu	Gly	Asn	Ile	
				205				210			215					
aca	att	cca	tgc	agg	ctt	gct	act	gtc	gct	tct	gga	gca	gct	tct	gga	845
Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	
				220				225			230			235		
ala	ctt	ttg	cag	tat	gaa	ctt	ggc	ggt	ccc	cgt	gtt	tgc	gtt	caa	aca	893
Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr	
				240				245				250				
gct	tat	ggt	ata	gag	gtt	gag	gtt	gaa	agc	ata	ccc	tat	gat	cca	agc	941
Ala	Tyr	Gly	Ile	Glu	Val	Glu	Val	Glu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Asp	Pro	Ser	
				255				260				265				
cta	atg	gtt	ttc	atg	gat	tat	aga	gac	tac	acc	aaa	cat	aaa	tct	caa	989
Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Lys	His	Lys	Ser	Gln	
				270				275			280					
tca	cta	gaa	gca	caa	tat	cca	aca	ttt	ttg	tat	gtc	atg	cca	atg	tct	1037
Ser	Leu	Glu	Ala	Gln	Tyr	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Pro	Met	Ser	
				285				290			295					
cca	act	aaa	gta	tcc	ttt	gag	gaa	act	tgt	ttg	gct	tca	aaa	gag	gcc	1085
Pro	Thr	Lys	Val	Phe	Phe	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ala	
				300				305			310			315		
atg	cct	ttt	gag	tta	ttg	aag	aca	aaa	ctc	atg	tca	aga	tta	aag	act	1133
Met	Pro	Phe	Glu	Leu	Leu	Lys	Thr	Lys	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr	
				320				325			330					
atg	ggg	atc	cga	ata	acc	aaa	act	tat	gaa	gag	gaa	tgg	tca	tat	att	1181
Met	Gly	Ile	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	
				335				340			345					
cca	gta	ggt	gga	tcc	tta	cca	aat	acc	gag	caa	aag	aac	ctt	gca	ttt	1229
Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Phe	
				350				355			360					
ggt	gct	gct	gct	agc	atg	gtg	cat	cca	gcc	aca	gga	tat	tcg	gtt	gta	1277
Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Val	His	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	
				365				370			375					
aga	tca	ctg	tca	gaa	gct	cct	aat	tat	gca	gca	gta	att	gca	aag	att	1325
Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ala	Ala	Val	Ile	Ala	Lys	Ile	
				380				385			390			395		
tta	ggg	aaa	gga	aat	tca	aaa	cag	atg	ctt	gat	cat	gga	aga	tac	aca	1373
Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Ser	Lys	Gln	Met	Leu	Asp	His	Gly	Arg	Tyr	Thr	
				400				405			410					

Fischfutter.ST25.txt

acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg	1421
Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg	
415 420 425	
aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag	1469
Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln	
430 435 440	
atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg	1517
Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu	
445 450 455	
ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act	1565
Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr	
460 465 470 475	
gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc	1613
Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser	
480 485 490	
ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga	1661
Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly	
495 500 505	
aa atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataaactcttag tcgcgcatcag	1711
Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile	
510 515	
tttagattat aggcacatct tgcatatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct	1771
tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg	1830

<210> 39

<211> 516

<212> PRT

<213> Tagetes erecta

<400> 39

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr	
5 10 15	

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys	
20 25 30	

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu	
35 40 45	

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met	
50 55 60	

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu	
65 70 75 80	

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp	
85 90 95	

Fischfutter.ST25.txt

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu-
100 105 110

Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro
115 120 125

Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly
130 135 140

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu
145 150 155 160

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser
165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly
180 185 190

Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn
195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg
210 215 220

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr
225 230 235 240

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu
245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met
260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln
275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe
290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu
305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile
325 330 335

Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser
340 345 350

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser
355 360 365

Fischfutter.ST25.txt

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu
370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn
385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys
405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala
420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly
435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp
450 455 460

[REDACTED]
P Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe
465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu
485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala
500 505 510

Tyr Leu Thr Ile
515

<210> 40

<211> 445

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Fragment

<222> (1)..(445)

<223>

<400> 40
aagcttgcac gaggcaaagc aaagggttgtt tggttgtt gttgagagac actccaatcc 60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggttc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180

Fischfutter.ST25.txt

ggcggctttt acatgcccta ggttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgcttttgt tcaaatgcaa cagaataagt ccatggatgc	360
acagtcttagc ctatccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg tcgac	445

<210> 41

<211> 446

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<21> Antisense Fragment

<222> (1)..(446)

<223>

<400> 41	
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggttgtt tggtgtgtt gttgagagac actccaatcc	60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtt ctaacaacag caacgaagaa	120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat	180
ggcggctttt acatgcccta ggttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgcttttgt tcaaatgcaa cagaataagt ccatggatgc	360
acagtcttagc ctatccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg gatcct	446

<210> 42

<211> 393

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Fragment

<222> (1)..(393)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 42
aagctttgga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg 60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtgggggtt cttggatctt cgttatcatc 120
aactgacttg ataataatatttgc cgttttacat gtttattcata gcaccgcata gcctgagaat 180
gggtctgggtt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag ttttagattat aggcacatct tgcataatata 300
tatgtataaa ctttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct 360
tgggttaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

<210> 43

<211> 397

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Antisense Fragment

<222> (1)..(397)

<223>

<400> 43
gaattctctt tggatttagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60
tccggacttt ctccgcttg cccacatgga tgtgggtggg gtttcttggga tcttcgttat 120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga 180
gaatgggtct ggtagacat ttgcgtttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt 240
tctcacgat ataaataact ctagtcgcga tcagtttaga ttataggcac atcttgcata 300
tatatatgtt taaaccttat gtgtgctgtt tccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360
ttcttgggtt aatgctgatg aagtattttc tggatcc 397

<210> 44

<211> 1537

<212> DNA

<213> -

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1537)

Fischfutter.ST25.txt

<223>

<400> 44
gagctctaca aattagggtt actttattca tttcatcca ttctctttat tgtaaattt 60
tgtacatttta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcacttct tattcataacc 120
tattcactca agccttacc atcttcctt tctattcaa tactatttct acttcatttt 180
tcacgttttt aacatcttcc tttatccctt gtccacttcg ttttagggatg cctaatgtcc 240
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300
aatacaaata aagtgaaaca aaatatctat aaataaacaa atatataatat tttgttagac 360
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaattttt gttatatttc tactttacct actaaatttg 420
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaattta taaaaaagaa agaaaaaaagc 480
aaaccctat taaaatagct aactataaga tcttaaaattt atcctcatca gtgtatagtt 540
attggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600
ctcacatttt ttaacttaag aaaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tatttattta aataaaaaag actaataaat 720
atataaaatg aatgttcata cgagaccca ttttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780
gattattttc aaaaactaagg ttgttagcaat attaaatcaa taaaatttattt ataaataaca 840
aaattaacct gctcgtttt gctgtatag ggaggctaca aaataaattt aactaaagat 900
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggtt ctcacaaggt tcaatagtca 1020
atattaggtt ttattggact ttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga actaaaaat 1080
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttataaca 1140
cgaaagcgta ttgtgtattt attcattttgg cgccctcacat gcttcgggtt gctcgcttt 1200
ctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctttcccta tgccacgtgt tctgagctta 1260
acaagccacg ttgcgtgcca ttgccaaaca agtcattttta acttcacaag gtccgattt 1320
acctccaaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcaaga tcaagggtat aatcgcttt 1380
ttgaattcta tttctctttta ttaatagtc cctctcggtt gatagttttt aaaagatttt 1440
taaaaacgtag ctgctgttta agttaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tttgtgtttt 1500
gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagttt 1537

<210> 45

<211> 734

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

Fischfutter.ST25.txt

<220>

<221> variation

<222> (1)..(734)

<223>

<400> 45		60
ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc		120
cctaggtta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc		180
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtgatcg		240
gagctgctt ttgttcaaata gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc		300
caaaaaggta ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgtttt taggaataat		360
gatatttaga tagatttagct atcacctgtg ctgtggatgt cagctcccaa gggtcttacc		420
agtaaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggaggtg ggggattata ggctttgttg		480
tgagaatgtt gagaagagg tttgacaaat cggtgatgg gatattaaag acggscata		540
attaaaaataa agagaagaga aagattaaga gggatggg gatattaaag acggscata		600
tagtgatgcc acgtagaaaa aggttaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct		660
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta		720
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggatgt ttgttggatgt tgagagacac tccaaatccaa		
acagatacaa ggcg		734

<210> 46

<211> 280

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> variation

<222> (1)..(280)

<223>

<400> 46		60
gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaaag attaagaggg tgatgggat		120
attaaagacg gccaatrttag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtggaaa acataacaacg		180
tggctttaaa agatggcttg gctgctaattc aactcaactc aactcatatc ctatccattc		240
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaaggttgt ttgttggatgt		

Fischfutter.ST25.txt

tggtgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga 280

<210> 47

<211> 358

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> Sense Promotor

<222> (1)..(358)

<223>

00> 47

cttaccg atagtaaaat cgtagttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60
gctttgttgt gagaatgttg agaaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgaggttaaa 120
tggagtttaa ttaaaataaaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180
cggccaatat agtgatgcc a cgtagaaaaa ggtaagtgaa aacatacaac gtggctttaa 240
aagatggctt ggctgctaat caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300
tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaagggttg tttgttgtg ttgtcgac 358

<210> 48

<211> 361

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

20>

<221> Antisense Promotor

<222> (1)..(361)

<223>

<400> 48

ctcgagctt ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60
taggcttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcggtgtt gaatgaggtt 120
aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gagggtgatg gggatattaa 180
agacggccaa tatagtgtatg ccacgttagaa aaaggtaatg gaaaacatac aacgtggctt 240
taaaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca tattcctatcc attcaaattc 300

Fischfutter.ST25.txt
aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagg aaagcaaagg ttgtttgttgc ttgttggatc 360
361
c

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

00> 49 28
gagctcactc actgatttcc attgcttg

<210> 50
<211> 37
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(37)
<223>

400> 50 37
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

<210> 51
<211> 34
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(34)

Fischfutter.ST25.txt

<223>

<400> 51
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<22> (1)..(25)

<223>

<400> 52
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<22> (1)..(23)

<223>

<400> 53
gaaaatactt catcagcatt acc

23

<210> 54

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

Seite 57

Fischfutter.ST25.txt

<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 54
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 55
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<20>
<21> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

<400> 55
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 56
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<20>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 56
aagcttgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 57
<211> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

Fischfutter.ST25.txt

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 57

gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 58

<211> 30

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 58

aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 59

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 59

gaattcgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 60

<211> 25

Fischfutter.ST25.txt

<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(25)
<223>

<400> 60
aagctttgga ttagcactga ttgtc

25

<210> 61
11> 29
12> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 61
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 62
11> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 62
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

Fischfutter.ST25.txt

<210> 63
<211> 27
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(27)
<223>

<400> 63
attctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 64
ccttgtat ctgtttggat tgg

23

<210> 65
<211> 24
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(24)
<223>

<400> 65
ctaacaatca atgagtatga gagc

<210> 66
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

400> 66
agagcaaggc cagcaggacc acaacc

26

<210> 67
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

400> 67
ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

<210> 68
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)

Fischfutter.ST25.txt

<223>

<400> 68
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 69

<211> 15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<22> (1)..(15)

<23>

<400> 69
gtcgagatag gagtt

15

<210> 70

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<22> (1)..(28)

<223>

<400> 70
aagcttacccg atagtaaaat cgtagtt

28

<210> 71

<211> 31

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

Fischfutter.ST25.txt

<221> Primer

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 71
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t

31

<210> 72

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<400> 72
cgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 73

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 73
ggatccaaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 74

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 74
gtcgactttt tggtaagag atttggtg

28

<210> 75

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<23>

<400> 75
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(22)

<23>

<400> 76
gagctctaca aatttagggtt ac

22

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

Fischfutter.ST25.txt

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 77
aaqcttatta tttccaaatt ccg

23

<210> 78

<21.1> 50

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

21 > Primer

22> (1)..(50)

<223>

<400> 78 aagctttgca attcatacag aagtgagaaa aatgcagct a gcagcga

50

<210> 79

<211> 1062

<212> DNA

<213> *Haematococcus pluvialis*

220>

21> CDS

<222> (32)..(1021)

<223>

<400> 79
aagcttgca attcatacag aagtgagaaa a atg cag cta gca gcg aca gta
Met Gln Leu Ala Ala Thr Val
1 5

52

atg ttg gag cag ctt acc gga agc gct gag gca ctc aag gag aag gag
 Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Lys Glu Lys Glu
 10 15 20

100

148

Fischfutter.ST25.txt

tac	tcg	ctt	ccg	tca	gag	gag	tca	gac	gcu	ccg	ccg	gga	ctg	aag	196
Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Ser	Asp	Ala	Ala	Arg	Pro	Gly	Leu	Lys
40					45				50					55	
aat	gcc	tac	aag	cca	cca	cct	tcc	gac	aca	aag	ggc	atc	aca	atg	gcu
Asn	Ala	Tyr	Lys	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Thr	Lys	Gly	Ile	Thr	Met	Ala
					60				65				70		
cta	gct	gtc	atc	ggc	tcc	tgg	gcc	gca	gtg	ttc	ctc	cac	gcc	att	ttt
Leu	Ala	Val	Ile	Gly	Ser	Trp	Ala	Ala	Val	Phe	Leu	His	Ala	Ile	Phe
					75				80				85		
caa	atc	aag	ctt	ccg	acc	tcc	ttg	gac	cag	ctg	cac	tgg	ctg	ccc	gtg
Gln	Ile	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Trp	Leu	Pro	Val
					90				95				100		
tca	gat	gcc	aca	gct	cag	ctg	gtt	agc	ggc	agc	agc	agc	ctg	ctg	cac
Ser	Asp	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Leu	His
					105				110				115		
atc	gtc	gta	gta	ttc	ttt	gtc	ctg	gag	ttc	ctg	tac	aca	ggc	ctt	ttt
Ile	Val	Val	Val	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe
					120				125				130		135
act	acc	acc	cat	gat	gct	atg	cat	ggc	acc	atc	gcc	atg	aga	aac	agg
Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ala	Met	His	Gly	Thr	Ile	Ala	Met	Arg	Asn	Arg
					140				145				150		
cag	ctt	aat	gac	ttc	ttg	ggc	aga	gtt	tgc	atc	tcc	ttg	tac	gcc	tgg
Gln	Leu	Asn	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	Cys	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ala	Trp
					155				160				165		
ttt	gat	tac	aac	atg	ctg	cac	cgc	aag	cat	tgg	gag	cac	cac	aac	cac
Phe	Asp	Tyr	Asn	Met	Leu	His	Arg	Lys	His	Trp	Glu	His	His	Asn	His
					170				175				180		
act	ggc	gag	gtg	ggc	aag	gac	cct	gac	ttc	cac	agg	gga	aac	cct	ggc
Thr	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Asp	Phe	His	Arg	Gly	Asn	Pro	Gly
					185				190				195		
att	gtg	ccc	tgg	ttt	gcc	agc	ttc	atg	tcc	agc	tac	atg	tcg	atg	tgg
Ile	Val	Pro	Trp	Phe	Ala	Ser	Phe	Met	Ser	Ser	Tyr	Met	Ser	Met	Trp
					200				205				210		215
cag	ttt	gct	cgc	ctc	gca	tgg	tgg	acg	gtg	gtc	atg	cag	ctg	ctg	gtt
Gln	Phe	Ala	Arg	Leu	Ala	Trp	Trp	Thr	Val	Val	Met	Gln	Leu	Leu	Gly
					220				225				230		
gcg	cca	atg	gct	aac	ctg	ctg	gtg	ttc	atg	gct	gcc	gcc	ccc	atc	ctg
Ala	Pro	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Val	Phe	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu
					235				240				245		
tcc	gcc	ttc	cgc	ttg	tcc	tac	ttt	ggc	acg	tac	atg	ccc	cac	aag	cct
Ser	Ala	Phe	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gly	Thr	Tyr	Met	Pro	His	Lys	Pro
					250				255				260		
gag	cct	ggc	gcc	gct	ggc	tct	tca	cca	gcc	gtc	atg	aac	tgg	tgg	868
Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Val	Met	Asn	Trp	Trp
					265				270				275		
aag	tcg	cgc	act	agc	cag	gct	tcc	gac	ctg	gtc	agc	ttt	ctg	acc	tgc
Lys	Ser	Arg	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	Thr	Cys
					280				285				290		295
tac	cac	ttc	gac	ctg	cac	tgg	gag	cac	cac	cgc	tgg	ccc	ttt	gcc	ccc
Tyr	His	Phe	Asp	Leu	His	Trp	Glu	His	His	Arg	Trp	Pro	Phe	Ala	Pro
					300				305				310		

Fischfutter.ST25.txt

tgg tgg gag ctg ccc aac tgc cgc cgc ctg tct ggc cga ggt ctg gtt 1012
 Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val
 315 320 325

cct gcc tag ctggacacac tgcaagtggc cctgctgcca gctgggcatg c 1062
 Pro Ala

<210> 80

<211> 329

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 80

Met Gln Leu Ala Ala Thr Val Met Leu Glu Gln Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Val Ala Gly Ser Ser Asp Val
 20 25 30

Leu Arg Thr Trp Ala Thr Gln Tyr Ser Leu Pro Ser Glu Glu Ser Asp
 35 40 45

Ala Ala Arg Pro Gly Leu Lys Asn Ala Tyr Lys Pro Pro Pro Ser Asp
 50 55 60

Thr Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Ala Val Ile Gly Ser Trp Ala Ala
 65 70 75 80

Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Lys Leu Pro Thr Ser Leu Asp
 85 90 95

Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Asp Ala Thr Ala Gln Leu Val Ser
 100 105 110

Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Val Val Val Phe Phe Val Leu Glu
 115 120 125

Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly
 130 135 140

Thr Ile Ala Met Arg Asn Arg Gln Leu Asn Asp Phe Leu Gly Arg Val
 145 150 155 160

Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Asn Met Leu His Arg Lys
 165 170 175

His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro Asp
 180 185 190

Fischfutter.ST25.txt

Phe His Arg Gly Asn Pro Gly Ile Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met
 195 200 205

Ser Ser Tyr Met Ser Met Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Thr
 210 215 220

Val Val Met Gln Leu Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe
 225 230 235 240

Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly
 245 250 255

Thr Tyr Met Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Gly Ser Ser
 260 265 270

Pro Ala Val Met Asn Trp Trp Lys Ser Arg Thr Ser Gln Ala Ser Asp
 275 280 285

Leu Val Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu His
 290 295 300

His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Glu Leu Pro Asn Cys Arg Arg
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala
 325

<210> 81

<211> 789

<212> DNA

<213> Nostoc punctiforme

<20>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223>

<400> 81
 ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa
 Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15

tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30

att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn

48

96

144

Fischfutter.ST25.txt
 35 40 45

tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa	192
Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln	
50 55 60	
atg ttc ctt tat aca ggg cta ttt att act gca cat gat gct atg cat	240
Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His	
65 70 75 80	
ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca	288
Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser	
85 90 95	
cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag	336
Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys	
100 105 110	
aat cat tgc tta cat cat cgt cat .cct 'gct agc gaa gtt gac cca gat	384
Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp	
115 120 125	
ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc	432
Leu His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe	
130 135 140	
atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta	480
Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu	
145 150 155 160	
ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc	528
Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile	
165 170 175	
tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat	576
Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr	
180 185 190	
ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat	624
Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr	
195 200 205	
ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc	672
Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile	
210 215 220	
at tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat	720
Leu Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His	
225 230 235 240	
gta cct tgg tgg caa ctt cca tct gta tat aag cag aga gta ttc aac	768
Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn	
245 250 255	
aat tca gta acc aat tcg taa	789
Asn Ser Val Thr Asn Ser	
260	

<210> 82

<211> 262

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

Fischfutter.ST25.txt

<400> 82

Met Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
20 25 30

Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
35 40 45

Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
50 55 60

Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
65 70 75 80

Arg Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
85 90 95

Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
100 105 110

Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
115 120 125

Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
130 135 140

Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
145 150 155 160

Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
165 170 175

Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
195 200 205

Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
245 250 255

Asn Ser Val Thr Asn Ser

<210> 83
 <211> 762
 <212> DNA
 <213> *Nostoc punctiforme*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(762)
 <223>

400> 83	48
g atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca	
t Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro	
5 10 15	
gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc	96
Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val	
20 25 30	
att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac	144
Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp	
35 40 45	
atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa	192
Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln	
50 55 60	
aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat	240
Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His	
65 70 75 80	
ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca	288
Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr	
85 90 95	
tg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa	336
Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys	
100 105 110	
aaa cat tgg tta cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat	384
Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp	
115 120 125	
ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt	432
Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe	
130 135 140	
atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att	480
Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile	
145 150 155 160	
tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act	528
Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr	
165 170 175	

Fischfutter.ST25.txt

tac	ttt	tgg	cta	ccc	tcg	ctt	tta	agt	tca	tta	caa	tta	ttc	tat	576	
Tyr	Phe	Trp	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	
180							185					190				
ttt	ggt	act	ttt	tta	ccc	cat	agt	gaa	cca	ata	ggg	ggt	tat	gtt	cag	624
Phe	Gly	Thr	Phe	Leu	Pro	His	Ser	Glu	Pro	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val	Gln	
195				200							205					
cct	cat	tgt	gcc	caa	aca	att	agc	cgt	cct	att	tgg	tgg	tca	ttt	atc	672
Pro	His	Cys	Ala	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Ile	Trp	Trp	Ser	Phe	Ile	
210					215						220					
acg	tgc	tat	cat	ttt	gac	tac	cac	gag	gaa	cat	cac	gaa	tat	cct	cat	720
Thr	Cys	Tyr	His	Phe	Gly	Tyr	His	Glu	Glu	His	His	Glu	Tyr	Pro	His	
225				230				235				240				
att	tct	tgg	tgg	cag	tta	cca	gaa	att	tac	aaa	gca	aaa	tag			762
Ile	Ser	Trp	Trp	Gln	Leu	Pro	Glu	Ile	Tyr	Lys	Ala	Lys				
					245				250							

<210> 84

<211> 253

<212> PRT

<213> Nostoc punctiforme

<400> 84

Met	Ile	Gln	Leu	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Pro
1				5					10				15		

Val	Leu	Arg	Ser	Lys	Ser	Gln	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Ile	Ala	Ile	Val
				20				25				30			

Ile	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	
					35		40				45			

Ile	Ser	Lys	Leu	Lys	Phe	Trp	Met	Leu	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Trp	Gln
				50		55				60					

Ile	Ser	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Thr	Ser	His	Asp	Ala	Met	His
				65		70			75			80				

Gly	Val	Val	Phe	Pro	Gln	Asn	Thr	Lys	Ile	Asn	His	Leu	Ile	Gly	Thr
					85			90			95				

Leu	Thr	Leu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Leu	Pro	Tyr	Gln	Lys	Leu	Leu	Lys
				100			105				110				

Lys	His	Trp	Leu	His	His	Asn	Pro	Ala	Ser	Ser	Ile	Asp	Pro	Asp	
				115		120					125				

Phe	His	Asn	Gly	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Phe	Ala	Trp	Tyr	Phe	His	Phe
				130				135			140				

Fischfutter.ST25.txt

Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
145 . . 150 . . 155 . . 160

Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
165 170 175

Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
180 185 190

Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
195 200 205

Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
210 215 220

Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys
245 250

<210> 85

<211> 804

<212> DNA

<213> *Synechococcus* WH8102

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(804)

<223>

<400> 85	atg aaa acg aca aga tct att tcg tgg cca tcg act tgc tgg cat cac	48
Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His		
1 5 10 15		
cag ccg agt tgc tca agc tgg gtg gca aat gag ttc agc cct cag gcc	96	
Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala		
20 25 30		
ctc aaa ggg ttg gct ctg gct ggt ctg att gga tca gcc tgg ctg ctc	144	
Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu		
35 40 45		
tcc ctg ggc ctg agc tac acc ctg cca ctt gat cag acg cct ggg ctg	192	
Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu		
50 55 60		
ttg att ggc agc ttg att ctg ctc aga gca ttt ctg cac acc ggg ctg	240	
Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu		

Fischfutter.ST25.txt

65	70	75	80	
ttc atc gtt gcc cac gat tcc atg cac gcc agt ctg gtt ccg ggt cat				288
Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His				
85	90	95		
ccc gga ttg aac cgc tgg atc ggc aaa gtg tat ttg ttg gtg tat gca				336
Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala				
100	105	110		
ggc ttg tct tat gag cgt tgg tcc cgc aac cac aga cgt cat cac ctg				384
Gly Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu				
115	120	125		
gca ccg gag acg ttc cag gat cct gac tac caa cgt tgc acc aat aac				432
Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn				
130	135	140		
aac atc cta gat tgg tat gtt cac ttc atg ggc aac tat ctg ggc atg				480
Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met				
145	150	155	160	
cgg caa ctg tta aat cta agc tgg ctt tgg ctg gcg cta atc att ctc				528
Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu				
165	170	175		
aac ggt tct gat ctc cct gct cag atc atg cat ctg ctg ttg ttc agc				576
Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser				
180	185	190		
gtt ctg ccg ttg atc atc agt tcc tgg caa ttg ttt cta gtg gga acc				624
Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr				
195	200	205		
tgg tta ccc cac cga cgt ggg gcc acg aca cga ccg ggc gtg aca acg				672
Trp Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr				
210	215	220		
cgc agc ctg gct ttg cat cca gcc ctc tct ttc gca gct tgg tac aac				720
Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn				
225	230	235	240	
ttt ggc tat cat cgt gaa cat cat gaa tcg cct tcc aca ccc tgg ttt				768
Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe				
245	250	255		
g ctg cca caa ctt cga aat gaa tca ttc act tga				804
Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr				
260	265			

<210> 86

<211> 267

<212> PRT

<213> Synechococcus WH8102

<400> 86

Met Lys Thr Thr Arg Ser Ile Ser Trp Pro Ser Thr Cys Trp His His
1 5 10 15

Gln Pro Ser Cys Ser Ser Trp Val Ala Asn Glu Phe Ser Pro Gln Ala
Seite 75

Fischfutter.ST25.txt
20 25 30

Leu Lys Gly Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ile Gly Ser Ala Trp Leu Leu
35 40 45

Ser Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Leu Pro Leu Asp Gln Thr Pro Gly Leu
50 55 60

Leu Ile Gly Ser Leu Ile Leu Leu Arg Ala Phe Leu His Thr Gly Leu
65 70 75 80

Phe Ile Val Ala His Asp Ser Met His Ala Ser Leu Val Pro Gly His
85 90 95

Pro Gly Leu Asn Arg Trp Ile Gly Lys Val Tyr Leu Leu Val Tyr Ala
100 105 110

[REDACTED] Leu Ser Tyr Glu Arg Cys Ser Arg Asn His Arg Arg His His Leu
115 120 125

Ala Pro Glu Thr Phe Gln Asp Pro Asp Tyr Gln Arg Cys Thr Asn Asn
130 135 140

Asn Ile Leu Asp Trp Tyr Val His Phe Met Gly Asn Tyr Leu Gly Met
145 150 155 160

Arg Gln Leu Leu Asn Leu Ser Cys Leu Trp Leu Ala Leu Ile Ile Leu
165 170 175

Asn Gly Ser Asp Leu Pro Ala Gln Ile Met His Leu Leu Leu Phe Ser
180 185 190

[REDACTED] Val Leu Pro Leu Ile Ile Ser Ser Cys Gln Leu Phe Leu Val Gly Thr
195 200 205

[REDACTED] P Leu Pro His Arg Arg Gly Ala Thr Thr Arg Pro Gly Val Thr Thr
210 215 220

Arg Ser Leu Ala Leu His Pro Ala Leu Ser Phe Ala Ala Cys Tyr Asn
225 230 235 240

Phe Gly Tyr His Arg Glu His His Glu Ser Pro Ser Thr Pro Trp Phe
245 250 255

Gln Leu Pro Gln Leu Arg Asn Glu Ser Phe Thr
260 265

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

Fischfutter.ST25.txt

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 87
gcatgctcta gacctataa agatatttt tga 33

<210> 88

<211> 33

12> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 88
gcatgcatct agaaatggtt cagtgtcaac cat 33

<210> 89

211> 805

12> DNA

<213> Nostoc sp. Strain PCC7120

<220>

<221> variation

<222> (1)..(805)

<223>

<400> 89
gcatgcatct agaaatggtt cagtgtcaac catcatctct gcattcagaa aaactggtgt 60
tattgtcatc gacaatcaga gatgataaaa atattaataa gggttatattt attgcctgct 120

Fischfutter.ST25.txt

ttatcttatt	tttatggca	attagttta	tcttattact	ctcaatagat	acatccataa	180
ttcataagag	cttattaggt	atagccatgc	tttggcagac	cttcttatat	acaggtttat	240
ttattactgc	tcatgatgcc	atgcacggcg	tagttatcc	caaaaatccc	agaataaata	300
atttatagg	taagctcact	ctaattttgt	atggactact	cccttataaa	gatttattga	360
aaaaacattt	gttacaccac	ggacatcctg	gtactgattt	agaccctgat	tattacaatg	420
gtcatccccca	aaacttcttt	cttggatcc	tacattttat	gaagtcttat	tggcgatgga	480
cgc当地at	cggatttagt	atgatttttc	atggacttaa	aaatctggtg	catataccag	540
aaaataat	aattatat	tggatgatac	cttctat	aagttcagta	caactat	600
attttggat	attttgcct	cataaaaage	tagaagg	ttataactaac	ccccattgt	660
cgc当地at	cccattacct	ctttttgg	ctttgttac	ttgttatc	ttcggctacc	720
acaaggaaca	tcacgaatac	cctcaacttc	cttggggaa	attacctgaa	gctcacaaaa	780
tatcttata	aggcttagag	catgc				805

<210> 90

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(35)

<223>

<400> 90

gctcttca ttatccat tttgatttcg tgacc

35

<210> 91

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(44)

<223>

Fischfutter.ST25.txt

<400> 91	aagcttgagc tcgggtgatc agaagaagaa gaagaagatg aact	44
<210> 92		
<211> 653		
<212> DNA		
<213> Arabidopsis thaliana		
<220>		
<221> promoter		
<222> (1)..(653)		
<223>		
<400> 92	gagctcttca ttatccgat tttgatttcg tgaccagcga acgcagaata cttgttgatg	60
	taatacttta cccgtgtaaa tcaaaaacaa aaaggctttt gagcttttg tagttgaatt	120
	tctctggctg atctttctg tacagattca tatatctgca gagacgatat cattgattat	180
	ttgagcttct tttgaactat ttcgtgtaat ttggatgag agctctatgt atgtgtgtaa	240
	actttgaaga caacaagaaa ggtaacaagt gagggaggga tgactccatg tcaaaataga	300
	tgtcataaga ggcccatcaa taagtgttg agcccattag ctggcccatg aactaccaga	360
	ttgtgagatg gatgtgtgaa cagttttttt tttgatgttag gactgaaatg tgaacaacag	420
	gcccattatggccatgaaa ggctaaatggacaatgat aagcagaaat aacttacccct ctctaacact	480
	tggccatcaca ttggccatcaca cacaatccac acacatccaa tcacaacccatc atcatatatc	540
	tcccgctaat ctttttttct ttgatctttt ttttttgct tattttttt ttgactttgat	600
	cccatca gttcatcttc ttcttcttct tctgatcaac cgagctcaag ctt	653
<210> 93		
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		
<221> primer_bind		
<222> (1)..(28)		
<223>		

Fischfutter.ST25.txt

<400> 93
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28

<210> 94

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 94
tagcttgagc tctttgttga agagatttgg 30

<210> 95

<211> 37

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(37)

<223>

<400> 95
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37

<210> 96

<211> 34

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(34)

Fischfutter.ST25.txt

<223>

<400> 96
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34